



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ  
ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ НОВИ САД  
ПРЕХРАМБЕНО ИНЖЕЊЕРСТВО



**Истраживање добијања, карактеризација и  
оптимизација својстава активног,  
биоразградивог, амбалажног материјала на  
бази погаче уљане тикве голице**

- Докторска дисертација -

Ментор:

Проф. др Вера Лазић

Кандидат:

Сандра Булут, магст. инж.

Нови Сад, 2021

**Породицу** сматрам основном људске заједнице и незаменљивом за духовни развој човека.

У **породици** се чува вера предака, држи се до основних духовних вредности, које нас воде кроз живот.

**Породица** је извор љубави, у њој се учимо дужности, жртвовању, заједничком подношењу невоља, као и подели радости.

**Породица** нам ствара осећање да смо заједно у свему и кад одемо из својих кућа, куда нас живот води.

**Породица** је „мала Црква“.

Њених светиња и обичаја ко се држи, тај не може залутати у овом отуђеном, испражњеном, посувраћеном свету.

- Патријарх српски Павле

Мојој **породици**  
оцу Новици, мајци Весни и брату Огњену

## Захвалница

Неизмерну захвалност дугујем свом ментору проф. др Вери Лазић на несебичном ангажовању и великој помоћи током израде докторске дисертације. Посебно хвала на стрпљењу, разумевању, пажњи, подршци, топлим речима. Хвала на Вашој вери и борби за мене до последњег радног дана Ваше пословне каријере.

Посебну захвалност дугујем члановима Комисије, на добронамерним и корисним сугестијама и коментарима. Др Сунчици Коцић-Танацков, пре свега, хвала на указаном поверењу, разумевању, несебичној подели знања и пријатељским саветима. Др Сенки Поповић хвала на пруженој могућности и поверењу да будем део тима на предмету Амбалажа и паковање, а посебно хвала на указаном времену када је било најпотребније. Проф. др Лидији Петровић хвала на стеченом знању током основних студија, које је и допринело стварању идеје ове докторске дисертације. Проф. др Тањи Петровић хвала на отвореност и спремност да ми изађе у сусрет онда када је било најпотребније.

Посебно се захваљујем колегама са предмета Амбалажа и паковање на великој теоријској и практичној помоћи током израде докторске дисертације. Невени хвала на пријатељским саветима, непресушеним темама, испијеним кафама, подршци и љубави. Данијели хвала на свакој „енглеској речи“, искреним пословним и животним саветима, хвала на смеху и дружењу. Сави хвала на незаборавним окупљањима и неисцрпним интересантним причама.

Срдечно се захваљујем свим осталим колегама са Технолошког факултета који су помогли и учествовали у реализацији експерименталног плана докторске дисертације: проф др. Гордани Димић, проф. др Радомиру Малбаши, проф. др Снежани Кравић, др Јасмини Витас, Вањи Шерегел, као и др Душану Адамовићу са Института за ратарство и повртарство Нови Сад, др Лати Пезо, са Института за општу и физичку хемију, Београд, и др Бранимиру Бајац, са Института БиоСенс, Нови Сад. А посебну захвалност дугујем мојим девојкама Милани, Ивани, Анити, Тањи, Јелени, Мии, на пријатељској подршци и разумевању.

Посебну захвалност дугујем својим пријатељима који су стрпљиво и уз велику подршку били и остали уз мене.

Највећу захвалност дугујем својој породици. Брату Огњену хвала на труду да разуме све моје проблеме, иако је и мени самој то претешко било. Хвала за несебичну финансијску помоћ, стрпљење и трпљење. Оцу Новици хвала на што је на свако моје „Тата“, већ био на ногама. Мајци Весни хвала што на питање других „Како све постижеш?“, она је увек била одговор. Хвала им што су веровали у мене и онда када сам сматрала да нема излаза. Хвала им за несебично одрицање свога задовољства зарад моје среће и безусловне пружене љубави. Своју докторску дисертацију посвећујем управо њима.

Сандра

**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ**  
**ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ НОВИ САД**

**КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА**

Редни број:  
РБР

Идентификациони  
број:  
ИБР

Тип  
документације: Монографска документација  
ТД

Тип записа:  
ТЗ Текстуални штампани материјал

Врста рада (дипл.,  
маг., докт.): Докторска дисертација  
ВР

Име и презиме  
аутора: Сандра Булут  
АУ

Ментор (титула,  
име, презиме,  
звање): др Вера Лазић, редовни професор у пензији  
МН

Наслов рада: Истраживање добијања, карактеризација и  
НР оптимизација својстава активног, биоразградивог,  
амбалажног материјала на бази погаче уљане тикве  
голице

Језик публикације: Српски језик, ћирилица  
ЈП

Језик извода: Српски/Енглески  
ЈИ

Земља  
публиковања: Република Србија  
ЗП

Уже географско  
подручје: АП Војводина  
УГП

Година: 2021  
ГО

Издавач: ауторски репринт  
ИЗ

Место и адреса: Булевар цара Лазара 1, 21 000 Нови Сад, Србија  
МА

Физички опис рада: 7 поглавља, 214 страна, 61 слика, 24 табела, 318  
ФО литературних навода

Научна област: Биотехничке науке  
НО

Научна дисциплина: Прехрамбено инжењерство  
НД

Предметна одредница, кључне речи: Активна амбалажа, биополимери, погача уљане тикве  
ПО голице, етарска уља, инкапсулација,  $\beta$ -циклодекстрин,  
УДК инклузиони комплекс, карактеристике

Чува се: Библиотека Технолошког факултета Нови Сад,  
ЧУ Универзитет у Новом Саду, Булевар цара Лазара 1,  
21000 Нови Сад, Србија

Важна напомена: -  
ВН

Извод: Предмет ове докторске дисертације је добијање  
ИЗ активних, биоразградивих, биополимерних амбалажних материјала на бази погаче уљане тикве голице (PuOC) и етарског уља ртањског чаја, *Satureja montana* L. или босиљка, *Ocimum basilicum* L., као и на бази погаче уљане тикве голице и инклузионог комплекса  $\beta$ -циклодекстрин/етарско уље *S. montana*. Утицај додатка ових различитих активних једињења на особине добијених филмова испитан је одређивањем физичко-механичких (дебљина, затезна јачина, издужење при кидању), физичко-хемијских (садржај влаге, укупна растворљивост, бубрење), баријерних (брзина пропустљивости водене паре, пропустљивост (трансмисија) светлости), структурних (FTIR спектроскопија), укупан садржај фенола, антиоксидативне активности (способност

неутрализује DPPH радикала, способност неутрализације OH радикала, редукциона моћ) и антибактеријске активности (диск-дифузиона метода), добијених биополимерних филмова. Пре карактеризације активних биополимерних филмова, испитана је и карактеризација самих етарских уља одређивањем хемијског састава (GC/MS анализа), структурних особина (FTIR спектроскопија), укупног садржаја фенола, антиоксидативне (способност неутрализације DPPH радикала, способност неутрализације OH радикала, редукциона моћ) и антибактеријске активности (диск-дифузиона метода) етарских уља, као и карактеризација добијених инклузионих комплекса одређивањем ефикасности инкапсулације и структурних особина (SEM микроскопија и FTIR спектроскопија).

У последњој фази истраживања испитана је миграција карвакрола и тимола, карактеристичних једињења етарског уља *S. montana*, из различитих активних биополимерних филмова (на бази PuOC, зеина, хитозана, скроба, желатина) са етарским уљем *S. montana* или инклузионим комплексом, у различите модел растворе (96 % етанол, 10 % етанол, дестилована вода, 3 % сирћетна киселина), симулаторе прехранбених намирница, применом HPLC.

Добијени резултати су показали да је додаток етарских уља у филмогене супсензије на бази PuOC имало значајан утицај на особине добијених филмова. Запажено је слабљење физичко-механичких особина, али и значајно побољшање физичко-хемијских и баријарних особина, које је указало на смањење осетљивости биополимерних филмова на влагу, воду и водену пару, и повећање заштитне баријере према UV и VIS светлости. Додатак етарског уља *S. montana* у биополимерне амбалажне материјале, довело је до повећања антиоксидативне активности добијених филмова, где је запажена нешто већа способност неутрализације слободних радикала (DPPH и OH), и значајно већа редукциона моћ у поређењу са контролом, филм на бази погаче уљане тикве голице

без етарских уља. Додатак етарског уља *S. montana*, такође је значајно побољшало антибактеријску активност биополимерног филма према различитим грам-позитивним (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* и *Bacillus cereus*) и грам-негативним бактеријама (*Escherichia coli* и *Salmonella Enteritidis*). Најосетљивије бактерије биле су *S. Enteritidis*, *B. cereus*, и *S. aureus*, редом, док су најмање осетљиве бактерије биле *E. coli* и *L. monocytogenes*. За разлику од етарског уља *S. montana*, додатак етарског уља *O. basilicum* у биополимерне амбалажне материјале, показао је мањи допринос на антиоксидативну активност добијених филмова, док није запажен ефекат на антибактеријску активност филма на бази погаче уљане тикве голице.

Додатак инклузионог комплекса у филмове на бази РцОС довело је до још већег смањења осетљивости филмова према влаги, води и воденој пари. Значајно су побољшана баријерна својства, где је пропустљивост водене паре смањена за скоро 60 %, док је смањење трансмисије светлости РцОС филма било и до 98 %. Постигнуто је значајно повећање способности неутрализације DPPH радикала контролног филма, филма без активних једињења, након додатка инклузионог комплекса. Поред повећања активности контролног филма, добијена је и значајно већа антиоксидативна активност филма са инклузионим комплексом у поређењу са активношћу филма са чистим етарским уљем у истој концентрацији.

Резултати миграције карвакрола су показали да је његов највећи садржај био у модел растворима етанола (96 % и 10 %), обзиром на његову хидрофобну природу и бољу растворљивост у органским растварачима. Већи садржај карвакрола, имали су филмови са чистим етарским уљем у поређењу са филмовима са додатком инклузионог комплекса. Ови резултати могу да укажу на чињеницу да није дошло до потпуног отпуштања садржаја карвакрола из инклузионог комплекса у модел растворе, услед заштићености фенолних компоненти етарског уља инкапсулирањем у

инклузиони комплекс, као и јаких веза између инклузионог комплекса и биополимерних филмова. Након инкорпорирања инклузионог комплекса у различите биополимерне протеинске, полисахаридне и композитне филмове (PиОС, зеин, хитозан, скроб, желатин), миграција карвакрола била је још више отежана. Резултати миграције тимола су показали да је садржај отпуштеног тимола у сва четири модел раствора, код свих биополимерних филмова био значајно мањи у поређењу са добијеним вредностима карвакрола, обзиром на његов мањи релативни удео код испитиваног етарског уља.

На основу добијених резултата може се закључити да се погача уљане тикве голице може успешно користити за добијање активног, биоразградивог амбалажног материјала са потенцијалом примене у прехранбеној индустрији. Добијени резултати представљају допринос науци али и добру основа за бројне правце будућих истраживања.

Датум прихватања  
теме од стране  
Сената:

29.03.2018.

ДП  
Датум одбране:  
ДО

председник: *Др Сунчица Коцић-Танацков*, доцент,  
Технолошки Факултет Нови Сад, Универзитет у Новом  
Саду

Чланови комисије:  
(име и презиме /  
титула / звање /  
назив  
организације /  
статус)  
КО

ментор: *Др Вера Лазић*, редовни професор у пензији,  
Технолошки Факултет Нови Сад, Универзитет у Новом  
Саду

члан: *Др Сенка Поповић*, доцент, Технолошки Факултет  
Нови Сад, Универзитет у Новом Саду

члан: *Др Лидија Петровић*, ванредни професор,  
Технолошки Факултет Нови Сад, Универзитет у Новом  
Саду

члан: *Др Тања Петровић*, ванредни професор,  
Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду



**UNIVERSITY OF NOVI SAD**  
**FACULTY OF TECHNOLOGY NOVI SAD**

**KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number:  
ANO  
Identification  
number: INO  
Document type: DT Monograph documentation  
Type of record: TR Textual printed material  
Contents code: CC Ph.D. Thesis  
Author: AU Sandra Bulut  
Mentor: MN Vera Lazić, Ph.D., Full Professor (retired)  
Title: TI Research of obtaining, characterization and optimization of  
properties of active, biodegradable, packaging material  
based on pumpkin oil cake  
Language of text: LT Serbian language, Cyrillic  
Language of  
abstract: LA English/ Serbian  
Country of  
publication: CP Republic of Serbia  
Locality of  
publication: LPb AP Vojvodina  
Publication year: PY 2021  
Publisher: PU Author's reprint  
Publication place: PP Bulevar cara Lazara 1, 21 000 Novi Sad, Serbia

Physical description: PD 7 chapters, 214 pages, 61 figures, 24 tables, 318 references

Scientific field: SF Biotechnical science

Scientific discipline: SD Food Engineering

Scientific discipline: SD Active packaging, biopolymers, pumpkin oil cake, essential oils, encapsulation,  $\beta$ -cyclodextrin, inclusion complex, characteristics

UC

Holding data: HD Library of the Faculty of Technology, University of Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, 21 000 Novi Sad, Serbia

Note: N -

Abstract: AB The subject of this doctoral dissertation is the development of active, biodegradable, biopolymer packaging materials based on pumpkin oil cake (PuOC) and winter savory, *Satureja montana* L. or basil, *Ocimum basilicum* L. essential oil, as well as based on pumpkin oil cake and  $\beta$ -cyclodextrin/*S. montana* essential oil inclusion complex. The influence of the addition of these different active compounds on the properties of the obtained films was examined by determining the physical-mechanical (thickness, tensile strength, elongation at break), physico-chemical (moisture content, total soluble matter, swelling), barrier (water vapour transmission rate and light permeability), structural (FTIR spectroscopy), total phenol content, antioxidant activity (ability to neutralize DPPH radicals, ability to neutralize OH radicals, reducing power) and antibacterial activity (disk diffusion method), obtained biopolymer films. Prior to the characterization of active biopolymer films, essential oils were characterized by determining the chemical composition (GC/MS analysis), structural properties (FTIR spectroscopy), total phenol content and their antioxidant (ability to neutralize DPPH radicals, ability to neutralize OH radicals, reducing power) and antibacterial activity (disk-diffusion method), as well as characterization of the obtained inclusion complexes by

determining encapsulation efficiency and structural properties (SEM analysis and FTIR spectrometry).

In the last phase of the research, the migration of carvacrol and thymol, characteristic compounds of *S. montana* essential oil, in various active biopolymer films (based on PuOC, zein, chitosan, starch, gelatin) with *S. montana* essential oil or inclusion complex, into different food simulants (96% ethanol, 10% ethanol, distilled water, 3% acetic acid), using HPLC, was analyzed.

The obtained results showed that the addition of essential oils to PuOC-based film-forming suspensions had a significant effect on the properties of the obtained films. Weakening of physical-mechanical properties was observed, but also significant improvement of physical-chemical and barrier properties, which indicated a decrease in the sensitivity of biopolymer films to moisture, water and water vapor, and an increase in the protective barrier to UV and VIS light. The addition of *S. montana* essential oil to the films led to an increase in their antioxidant activity, where a slightly higher ability to neutralize free radicals (DPPH and OH), and a significantly higher reducing power compared to the control, PuOC-film without essential oil, was observed. The addition of *S. montana* essential oil also significantly improved the antibacterial activity of the biopolymer film against various gram-positive (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*) and gram-negative (*Escherichia coli* and *Salmonella Enteritidis*) bacteria. The most susceptible bacteria were *S. Enteritidis*, *B. cereus* and *S. aureus*, respectively, while the least susceptible bacteria were *E. coli* and *L. monocytogenes*. In contrast to *S. montana* essential oil, the addition of *O. basilicum* essential oil to biopolymer films showed less contribution to the antioxidant activity of the films, and no contribution to the antibacterial activity of the control film. The addition of the inclusion complex to PuOC-based films led to an even higher reduction in the sensitivity of the films to moisture, water and water vapor. Barrier properties were significantly improved, water vapor permeability was reduced by almost 60 %, while the reduction of light transmission of PuOC film was up to 98 %. A significant

increase in the ability to neutralize DPPH radicals of the control film, a film without active compounds, was achieved after the addition of the inclusion complex. In addition to the increase in the activity of the control film, a significantly higher antioxidant activity of the film with the inclusion complex was obtained compared to the activity of the film with pure essential oil in the same concentration. The migration results of carvacrol showed that its highest content was in model ethanol solutions (96% and 10%), given its hydrophobic nature and better solubility in organic solvents. Films with pure essential oil had a higher content of carvacrol compared to films with the addition of an inclusion complex. These results may indicate that carvacrol content was not completely released from the inclusion complex into the solution model, due to the protection of the phenolic components of the essential oil by encapsulation in the inclusion complex, and strong bonds between the inclusion complex and biopolymer films. After incorporation of the inclusion complex into various biopolymer protein, polysaccharide and composite films (based on PuOC, zein, chitosan, starch, gelatin), the migration of carvacrol was made even more difficult. The results of thymol migration showed that the content of released thymol in all four food simulants, for all biopolymer films, was significantly lower compared to the obtained values of carvacrol, given its lower relative share in the tested essential oil.

Based on the obtained results, it can be concluded that the pumpkin oil cake can be successfully used to obtain active, biodegradable packaging material with the potential for application in the food industry. The obtained results represent a contribution to science, but also a good basis for numerous future research.

Accepted on Senate

on:

AS

Defended:

DE

Thesis Defend

Board:

29.03.2018.

President: *Sunčica Kocić-Tanackov*, Ph.D., Assistant  
Professor, Faculty of Technology, University of Novi Sad

DB

Mentor: *Vera Lazić*, Ph.D., Full Professor (retired), Faculty of Technology, University of Novi Sad

Member: *Senka Popović*, Ph.D., Assistant Professor, Faculty of Technology, University of Novi Sad

Member: *Lidija Petrović*, Ph.D., Associate professor, Faculty of Technology, University of Novi Sad

Member: *Tanja Petrović*, Ph.D., Associate professor, Faculty of Agriculture, University of Belgrade

# САДРЖАЈ

<b>1. УВОД.....</b>	<b>1</b>
1.1. Научни циљеви истраживања .....	5
<b>2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ.....</b>	<b>7</b>
2.1. Амбалажа и животна средина .....	8
2.2. Биополимерни амбалажни материјали.....	11
2.2.1. Подела биополимера и биополимерних амбалажних материјала.....	13
2.2.2. Добијање биополимерних амбалажних материјала .....	19
2.2.3. Карактеризација биополимерних амбалажних материјала .....	21
2.3. Биополимерни амбалажни материјали на бази погаче уљане тикве голице .....	32
2.4. Активни биополимерни амбалажни материјали.....	36
2.5. Примена етарских уља код добијања активних биополимерних амбалажних материјала ...	38
2.5.1. Етарска уља <i>Satureja montana</i> L. и <i>Ocimum basilicum</i> L. ....	42
2.6. Примена инкапсулације и $\beta$ -циклодекстрина код добијања активних биополимерних амбалажних материјала .....	45
2.6.1. Значај и циљ инкапсулације .....	46
2.6.2. Технике инкапсулације .....	48
2.6.3. Молекуларна инклузија применом $\beta$ -циклодекстрина.....	51
<b>3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО.....</b>	<b>61</b>
3.1. Материјал .....	62
3.2. Задаци експерименталног рада.....	63
3.3. Карактеризација етарских уља <i>S. montana</i> и <i>O. basilicum</i> .....	67
3.4. Добијање и карактеризација инклузионог комплекса $\beta$ -циклодекстрин/етарско уље <i>S. montana</i> .....	69
3.4.1. Добијање инклузионог комплекса .....	69
3.4.2. Карактеризација инклузионог комплекса.....	71
3.5. Добијање активних биополимерних филмова.....	73
3.5.1. Добијање активних биополимерних филмова на бази погаче уљане тикве голице .....	73
3.5.2. Добијање активних биополимерних филмова на бази погаче уљане тикве голице и етарског уља <i>S. montana</i> или <i>O. basilicum</i> .....	74
3.5.3. Добијање активних биополимерних филмова на бази погаче уљане тикве голице и инклузионог комплекса .....	76

3.5.4. Добијање активних биополимерних филмова на бази зеина, хитозана, скроба и желатина, и етарског уља <i>S. montana</i> или инклузионог комплекса .....	78
3.6. Карактеризација активних биополимерних филмова .....	79
3.6.1. Физичко-механичке особине .....	79
3.6.2. Физичко-хемијске особине .....	80
3.6.3. Баријерне особине .....	81
3.6.4. Структурне особине .....	81
3.6.5. Укупан садржај фенола.....	82
3.6.6. Антиоксидативна активност .....	82
3.6.7. Антибактеријска активност.....	84
3.7. Одређивање миграције карвакрола и тимола из биополимерних активних филмова са етарским уљем <i>S. montana</i> или инклузионим комплексом у модел растворе .....	86
3.8. Методе статистичке обраде података.....	89
<b>4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА .....</b>	<b>91</b>
4.1. Карактеризација етарских уља <i>S. montana</i> и <i>O. basilicum</i> .....	92
4.1.1. Хемијски састав етарског уља <i>S. montana</i> .....	92
4.1.2. Хемијски састав етарског уља <i>O. basilicum</i> .....	95
4.1.3. Структурне особине етарског уља <i>S. montana</i> .....	97
4.1.4. Структурне особине етарског уља <i>O. basilicum</i> .....	101
4.1.5. Укупан садржај фенола у етарским уљима <i>S. montana</i> и <i>O. basilicum</i> .....	103
4.1.6. Антиоксидативна активност етарских уља <i>S. montana</i> и <i>O. basilicum</i> .....	105
4.1.7. Антибактеријска активност етарских уља <i>S. montana</i> и <i>O. basilicum</i> .....	107
4.2. Карактеризација активних биополимерних филмова на бази погаче уљане тикве голице и етарског уља <i>S. montana</i> или <i>O. basilicum</i> .....	110
4.2.1. Физичко-механичке особине .....	111
4.2.2. Физичко-хемијске особине .....	115
4.2.3. Баријерне особине .....	117
4.2.4. Структурне особине .....	121
4.2.5. Укупан садржај фенола.....	124
4.2.6. Антиоксидативна активност .....	126
4.2.7. Антибактеријска активност.....	130
4.3. Карактеризација инклузионог комплекса $\beta$ -циклодекстрин/етарско уље <i>S. montana</i> .....	134
4.3.1. Ефикасност инкапсулације .....	134
4.3.2. Структурне особине .....	139

4.4. Карактеризација активних биополимерних филмова на бази погаче уљане тикве голице и инклузионог комплекса.....	147
4.4.1. Физичко-механичке особине .....	149
4.4.2. Физичко-хемијске особине .....	151
4.4.3. Баријерне особине .....	153
4.4.4. Структурне особине .....	157
4.4.5. Антиоксидативна активност .....	159
4.5. Миграција карвакрола и тимола из биополимерних активних филмова са етарским уљем <i>S. montana</i> или инклузионим комплексом у модел растворе.....	162
<b>5. ЗАКЉУЧЦИ.....</b>	<b>172</b>
<b>6. ЛИТЕРАТУРА .....</b>	<b>178</b>
<b>7. ПРИЛОЗИ .....</b>	<b>201</b>



## ***1. УВОД***

Колики је значај амбалаже довољно је рећи да практично не постоји грана индустрије где амбалажа не налази примену. Са аспекта прехранбене индустрије, амбалажа чини целину са производом, и свака производна линија у прехранбеној индустрији завршава се паковањем производа. Примарна улога амбалаже је да заштити упаковани производ од различитих, пре свега, спољашњих фактора, као и да одржи квалитет производа током рока трајања.

Захваљујући својим одличним својствима, добрим физичко-механичким и баријерним особинама према неповољним факторима спољашње средине, релативно ниске цене, практичности примене, лакоће прераде, полимерни амбалажни материјали представљају једне од најзаступљенијих материјала у светској индустрији амбалаже. Особина која их посебно издваја је велика могућност комбиновања једног полимерног материјала са другим или са више њих, формирајући тако дуплексе и вишеслојне материјале, као и комбиновање са другим амбалажним материјалима, као што су папир, картон итд., добијајући на овај начин амбалажу са различитим особинама, и омогућену широку примену за паковање скоро свих прехранбених производа. Међутим, највећи недостатак примене полимерних амбалажних материјала огледа се пре свега у њиховом дугом животном веку и великом еколошком оптерећењу животне средине. Из тог разлога, полимерни амбалажни материјали представљају озбиљан глобални еколошки проблем. Поред тога, за добијање полимерних материјала користи се необновљива сировина (нафта), а све већи тренд данашњице, како код потрошача тако и, наравно, код произвођача је окретање ка природи и сировинама добијеним из природних извора. Због наведених разлога, истраживања, произвођачи и индустрија се све више окрећу ка проналаску глобалног решења и смањењу амбалажног отпада, као и све мањем оптерећењу нафте која полако нестаје. Као могућа алтернатива синтетским полимерним материјалима појавили су се биополимерни амбалажни материјали.

Биополимерни амбалажни материјали се добијају из обновљивих природних ресурса и под утицајем различитих спољашњих фактора разлажу се у спољашњој средини. Многобројна истраживања указала су на добра филмогена својства, механичка, физичко-хемијска и баријерна својства биополимерних материјала добијених из различитих природних извора. Због велике доступности сировина највише истраживани биополимерни материјали су добијени од протеина, полисахарида и липида, а посебну категорију чине композитни биополимерни материјали који се састоје од два или више биополимера, који својим својствима различито доприносе добијеном материјалу.

Са економског и еколошког становишта, посебно су интересантни композитни филмови добијени директно из нуспроизвода агроиндустрије. Са аспекта одрживог развоја и заштите животне средине, индустријска производња има као крајњи циљ максимално

искоришћење свих ресурса, а обзиром да су добијени нуспроизводи често врло богати различитим биополимерима, њихово искоришћење за производњу биополимерних амбалажних материјала може значајно допринети опоравку и искоришћењу отпада односно нуспроизвода. У индустрији уља, приликом добијања уља из семена уљарица, пресовањем уљаних семенки, остају нутритивно вредни нуспроизводи који се називају погаче. Обзиром на њихов састав, висок садржај протеина и полисахарида, као и липида у мањем проценту, ови производи могу наћи примену као сировина за добијање еколошки прихватљивих биополимерних материјала.

Семе тикве, *Curcubita pepo* L. представља важну уљарицу у Србији, и широко се користи за производњу јестивог уља. Главни нуспроизвод добијен након издвајања уља из семена хладним пресовањем, представља одмашћена погача уљане тикве голице. Овај нуспроизвод је богат протеинима, угљеним хидратима, уљима, сировим влакнима и другим компонентама. Због свог хемијског састава, погача уљане тикве голице представља интересантну сировину за добијање биополимерних композитних филмова. Обзиром да се добија из агро-индустријског отпада, њена употреба за добијање биополимерних амбалажних материјала може допринети смањењу отпада у животној средини. Истраживања су већ указала на одлична својства биополимерних материјала на бази погаче уљане тикве голице, која су по много чему упоредива са синтетским полимерним материјалима. Међутим, њихов највећи недостатак огледа се у великој осетљивости на воду и влагу, односно слабу баријеру према воденој пари, што уједно и ограничава њихову употребу за паковање производа са већим садржајем влаге.

Један од могућих начина решавања овог недостатка је инкорпорирање различитих хидрофобних компоненти у биополимерни филмогени раствор. У ове сврхе све већу примену налазе етарска уља која, поред тога што доприносе смањењу осетљивости биополимерних материјала на влагу, њиховим инкорпорирањем у биополимерни материјал, услед потврђене антиоксидативне и антимикробне активности етарских уља, могуће је добијање активних амбалажних материјала. Добијањем активне амбалаже са инкорпорираним етарским уљима, може се омогућити примена мање количине етарских уља као адитива у прехранбеној индустрији, смањење утицаја на сензорска својства производа, као и контролисано и успорено ослобађање активних компоненти из материјала на производ, у циљу очувања квалитета производа и могућности продужетка његове одрживости.

Истраживање утицај различитих етарских уља на својства бројних материјала на бази биополимера предмет је изучавања последњих неколико година. Међутим, показало се да и овај приступ има одређене недостатке. Током припреме филма, активност агенаса која се додају у филмогену емулзију, може се смањити услед утицаја различитих фактора

који се примењују за припрему биополимерног амбалажног материјала. Губитак активности једињења која се додају у активне материјале, доводи и до губитка активности активног паковања током времена. Такође, хидрофобне компоненте попут етарских уља, имају слабу растворљивост у води, док је већина биополимера који се користе за синтезу филмова растворљива у води. Услед ове фазне некомпатибилности, уградњу хидрофобних једињења у филмове на бази биополимера често је врло тешко постићи.

Нови приступ у индустрији конзервирања хране укључује употребу различитих материја за инкапсулацију како би се добиле микро и наночестице, намењене заштити активних компоненти. На овај начин, употребом хидрофилног материјала за формирање зида капсула, активна компонента се лако може инкорпорирати у хидрофилне биополимерне филмове. Поред тога, инкапсулацијом етарских уља, може се смањити њихова испарљивост и сензорски утицај на производ, али и повећати њихова заштита од различитих спољашњих фактора. Одабиром одговарајућих омотача и методе инкапсулације, могло би се омогућити постепено ослобађање активних компоненти, под одређеним, жељеним условима, и тако утицати на одрживост квалитета упакованог производа током дужег временског периода, па чак и продужити његов рок трајања. Микрочестице се могу додати директно у прехрамбени производ или се могу уградити у амбалажне материјале за паковање у циљу добијања активне амбалаже.

Последњих година све је већа заинтересованост за уградњу микро и наночестица у биополимерне амбалажне материјале у циљу добијања активних материјала, као и добијања материјала са продуженим, контролисаним отпуштањем активне компоненте. У овом контексту  $\beta$ -циклодекстрин је нашао значајну примену, јер формира инклузионе комплексе са хидрофобним компонентама, као што су етарска уља, и на овај начин може омогућити маскирање ароме етарских уља, и смањити њихов сензорски утицај на прехрамбене производе, као и заштитити активну компоненту од оксидације и оштећења која могу настати у току производње активних материјала, и повећати њихову растворљивост у хидрофилне филмогене матриксе, и тако обезбеди ефикасност и активност етарских уља за дужи временски период.

---

## 1.1. Научни циљеви истраживања

---

И поред дугогодишњег истраживања биополимерних материјала на бази погаче уљане тикве голице, детаљној оптимизацији, карактеризацији и модификацији добијених материјала, њихова употреба као носача (матрикс) за различите активне компоненте, у циљу добијања активних амбалажних материјала и активног паковања, до сада није довољно испитана.

Основни циљ ове докторске дисертације и истраживања је развој биоразградивих, активних, биополимерних композитних филмова на бази погаче уљане тикве голице и етарског уља ртањског чаја, *Satureja montana* L. или босиљка, *Ocimum basilicum* L., као и филмова на бази погаче уљане тикве голице и инклузионог комплекса  $\beta$ -циклодекстрин/етарско уље *Satureja montana* L.. Истраживања су обухватила пет целина:

### 1. Карактеризација етарских уља *S. montana* и *O. basilicum*.

Циљ прве целине био је да се испитају особине етарских уља, ртањског чаја, *S. montana* L. и босиљка, *O. basilicum* L., пре њихове примене за добијање биополимерних амбалажних материјала. Ове биљке, као и њихова етарска уља, због познатог позитивног различитог деловања на људски организам, налазе већ годинама значајну примену у медицини, фармацеутској и прехранбеној индустрији. Припадају најмногобројнијој породици лековитих биљака *Lamiaceae*, и веома су карактеристичне за подручје Републике Србије, али и Балканског полуострва. Карактеризација је извршена испитивањем хемијског састава, структурних особина, укупног садржаја фенола, антиоксидативне и антибактеријске активности етарских уља.

### 2. Добијање и карактеризација активних филмова на бази погаче уљане тикве голице и етарског уља *S. montana* или *O. basilicum*.

Након детаљне карактеризације етарских уља, циљ друге целине био је добијање активних композитних филмова на бази погаче уљане тикве голице и етарског уља *S. montana* или *O. basilicum*. Оптимизација активних филмова је извршена додатком различитих концентрација етарских уља, а њихов утицај на особине добијених филмова је испитан одређивањем физичко-механичких, физичко-хемијских, баријерних и структурних особина, укупног садржаја фенола, антиоксидативне и антибактеријске активности добијених активних филмова.

**3. Добијање и карактеризација инклузионог комплекса  $\beta$ -циклодекстрин/етарско уље *S. montana*.**

Циљ треће целине докторске дисертације био је добијање инклузионих комплекса на бази  $\beta$ -циклодекстрина и етарског уља *S. montana*. Оптимизација је извршена применом различитих односа етарског уља и  $\beta$ -циклодекстрина, и применом различитог поступка сушења инклузионих комплекса. Карактеризација добијених инклузионих комплекса испитана је у виду одређивања ефикасности инкапсулације и структурних особина.

**4. Добијање и карактеризација активних филмова на бази погаче уљане тикве голице и инклузионог комплекса  $\beta$ -циклодекстрин/етарско уље *S. montana*.**

Циљ четврте целине обухватао је добијање активних биополимерних филмова на бази погаче уљане тикве голице и инклузионог комплекса  $\beta$ -циклодекстрин/етарско уље *S. montana*. Оптимизација добијених активних филмова је извршена додатком различитих концентрација инклузионог комплекса, а његов утицај на особине биополимерних филмова је одређен испитивањем физичко-механичких, физичко-хемијских, баријерних и структурних особина, и антиоксидативне активности добијених филмова.

**5. Одређивање миграције карвакрола и тимола из различитих биополимерних активних филмова са етарским уљем *S. montana* или инклузионим комплексом  $\beta$ -циклодекстрин/етарско уље *S. montana* у различите модел растворе, симулаторе хране.**

Последња фаза истраживања ове докторске дисертације, обухватала је одређивање миграције карвакрола и тимола, карактеристичних компоненти етарског уља *S. montana*, из различитих активних полисахаридних, протеинских и композитних биополимерних филмова (на бази погаче уљане тикве голице, зеина, хитозана, скроба, желатина), са етарским уљем *S. montana* или инклузионим комплексом  $\beta$ -циклодекстрин/етарско уље *S. montana*, у циљу одређивања могућности њихове примене као носача (матрикс) активних фенолних компоненти. Миграција карвакрола и тимола је испитана у четири различита модел раствора, симулатора прехранбених намирница (96 % етанол, 10 % етанол, дестилована вода, 3 % сирћетна киселина).

## ***2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ***

---

## 2.1. Амбалажа и животна средина

---

Примарна и најважнија улога амбалаже је да штити упаковани производ од момента његовог паковања па све до његове употребе. Осим основне, заштитне улоге амбалажа има још, споредних улога, као што су складишно-транспортна и информативна, продајна функција, где својим атрактивним изгледом и дизајном, амбалажа може да изазове заинтересованост код купаца и потрошача, и продају производа (*Lazić u Popović, 2015*).

Практично да не постоји грана индустрије где амбалажа не налази примену и значај. У зависности од природе материјала од ког се добија, амбалажа се може поделити на металну, стаклену, папирну и картонску, дрвену, пластичну (полимерну), вишеслојну, комбиновану, текстилну и керамичку, при чему полимерни амбалажни материјали, поред папира и картона, представљају најзаступљеније амбалажне материјале у светској индустрији амбалаже (*Lazić u Popović, 2015*).

Захваљујући својим одличним својствима, добрим физичко-механичким и баријерним особинама према неповољним факторима спољашње средине (влага, кисеоник, микроорганизми), практичности примене, лакоће прераде, релативно ниске цене, као и велике могућности комбиновања, амбалажа од полимерних материјала се може прилагодити за паковање практично свих производа који се налазе на тржишту (*Lazić u Novaković, 2010*). По уделу појединих амбалажних материјала у светској индустрији амбалаже, пластика се налази на другом месту са уделом од 34 %, одмах после папира и картона који су заступљени са нешто већим уделом (36 %) (*Lazić u Popović, 2015*).

Индустрија пластике представља велики значај за европску економију. Произвођачи пластичних сировина, синтетских материјала, прерађивачи пластике, произвођачи рециклиране пластике итд., заједно чине ланац вредности који запошљава преко 1,5 милиона људи у Европи, кроз више од 55 000 компанија. Ове компаније су 2019. године створиле промет од преко 350 милијарди евра и европским јавним финансијама допринели са више од 30 милијарди евра. У 2019. години светска производња пластике скоро је достигла 370 милиона тона, док је у Европи производња пластике била скоро 58 милиона тона (**Слика 2.1.**). Највећа производња пластике у 2019. години била је у Азији, са уделом производње од 51 %, где је Кина достигла 31 % светске производње пластике ([www.plasticseurope.org](http://www.plasticseurope.org)).





**Слика 2. 1.** Производња пластике у Свету и Европи у 2019. години ([www.plasticseurope.org](http://www.plasticseurope.org))

Према подацима из 2019. године на сајту удружења произвођача пластике, примена пластичних материјала као амбалажних материјала у индустрији паковања, представља највеће тржиште и највећу потражњу пластике у Европи, са уделом од 39,6 % (**Слика 2.2.**) ([www.plasticseurope.org](http://www.plasticseurope.org)).



**Слика 2. 2.** Укупна потражња пластике у Европи и њена примена у различитим гранама индустрије ([www.plasticseurope.org](http://www.plasticseurope.org)).

Сви ови статистички подаци о пластици и синтетским материјалима, указују на њихову широку употребу и важност у различитим гранама индустрије, посебно индустрије паковања, како би одржали квалитет упакованог производа, омогућили његову лакшу манипулацију и што дужи рок трајања. Са порастом броја становништва се повећава и потреба ових материјала. Сви материјали који налазе примену у различитим гранама индустрије, након употребе се одбацују у животну средину и тако утичу на њу. Из тог разлога, поред разноразних функција амбалаже, она мора да буде и еколошки подобна, тако да након одлагања у спољашњу средину не показује штетан утицај (*Lazić и Popović,*

2015). Еколошка подобност материјала наметнула се осамдесетих година прошлог века, као последица све озбиљнијих захтева који се постављају у свим сферама људске делатности у погледу заштите животне средине (*Lazić u Novaković, 2010*). Када је у питању развој амбалажних материјала и амбалаже, може се рећи да иде у правцу побољшања еколошких својстава, односно смањења негативних утицаја на животну средину (*Lazić u Popović, 2015*). Овај правац огледа се у циљевима смањења употребе необновљивих сировина, смањењу отпада, могућој поновној употреби материјала, рециклажи, сагоревању и смањењу масе за одлагање у депоније (*Weber, 2000; Lazić u cap., 2008; Lazić u Popović, 2015*).

Када су у питању пластични материјали, као водећи материјали у индустрији амбалаже и паковања, основни еколошки проблеми су пре свега њихов дуг животни век, односно неразградивост. Ова њихова карактеристика је главни узрок све већег гомилања амбалажног отпада, која директно утиче на животну средину узрокујући емисију гасова, загађење тла али и водених површина. Значајан утицај се запажа и на животиње, па путем ланца исхране одређени део микропластике долази и до организма људи. У амбалажној индустрији је могуће примењивати принципе одрживог развоја. Преласком из линеарног у кружни-циклични индустријски систем, одбачена амбалажа постаје сировина у следећем циклусу производње. Поступак сакупљања, сортирања и припреме секундарне сировине завршава се рециклажом материјала. Настали материјал се може вратити у исти процес, а може бити сировина у неком другом производном процесу (*Marsh u Bugusu, 2007; Lazić u Popović, 2015*).

Други важан проблем синтетске пластике је што се добија од необновљивих сировина, односно нафте. Већина полимера који се користе, добијају се из нафте. Један део тих полимера враћа се поново у процес производње и прераде, чиме се штеде необновљиви извори, а други део након употребе ипак остаје у виду амбалажног смећа. Високе цене нафте утичу на све већу потражњу нових извора за добијање амбалажних материјала, а обзиром на све већу свест становништва по питању животне средине, истраживачи и произвођачи су усмерени на употребу природних, обновљивих извора. Како би се смањило амбалажно смеће, прибегава се проналажењу и стварању алтернативних, самоуништивих, разградивих или биоразградивих материјала (*Lazić u Popović, 2015*).

---

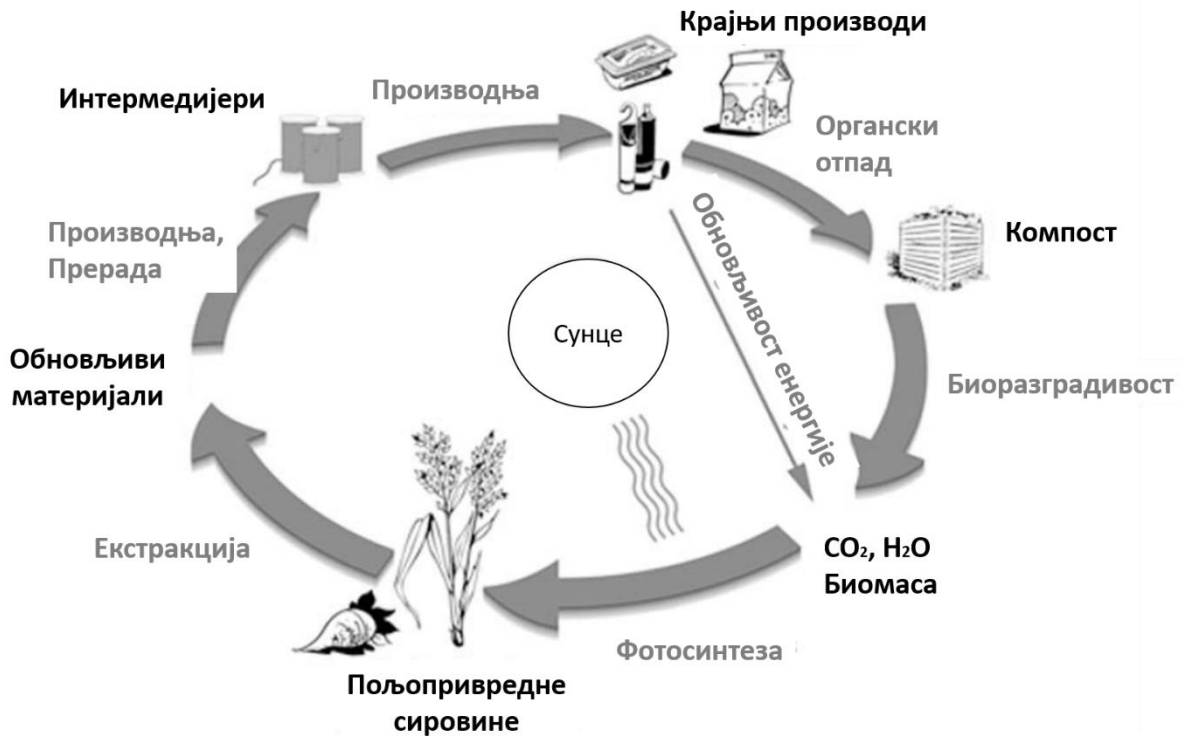
## 2.2. Биополимерни амбалажни материјали

---

Биополимери су полимери који се добијају из различитих обновљивих извора, а након одлагања у спољашњу средину, долази до њихове разградње услед утицаја различитих спољашњих фактора, најчешће микроорганизама. Због ових карактеристика сматрају се еколошки подобнијим материјалима и одличном алтернативом за синтетске полимере. Употребом биополимера значајно се смањује потрошња необновљивих извора, као и потрошња енергије за њихову производњу, и смањење амбалажног отпада, што погодује очувању животне средине. Идеја биоразградивих полимера из обновљивих извора – биополимера, потиче из потребе за затварањем природног циклуса материје, при чему завршетак једног циклуса означава почетак наредног циклуса (*Lazić u Popović, 2015*).

Због ових еколошки повољних карактеристика научници и произвођачи су све више усмерени на добијање биополимерних амбалажних материјала у циљу замене и смањења употребе синтетских материјала. Биополимери су нашли примену у скоро свим гранама индустрије, али посебан значај представља прехранбена индустрија, где се користе као сировина за добијање амбалаже и амбалажних материјала за паковање различитих прехранбених производа. Међутим, да би неки амбалажни материјал могао да се користи за паковање, потребно је да поред еколошких аспеката задовољи и друге особине, као што су физичко-механичке, баријерне, физичко-хемијске, итд., све у зависности од врсте производа који се пакује. У овом сегменту, биополимерни амбалажни материјали, као и синтетски полимери, морају пре свега да заштите упаковани производ од различитих спољашњих фактора, одрже квалитет упаковане намирнице у предвиђеном року трајања, као и да својим својствима не утиче на упаковани производ (*Coles u cap., 2003; Lazić u Popović, 2015*).

Према *European Bioplastics* ([www.european-bioplastic.org](http://www.european-bioplastic.org)), биополимери морају бити биоразградиви и/или компостабилни, тако да након њихове употребе може доћи до разградње под утицајем природних спољашњих фактора, или се могу користити као ђубриво или средство за побољшање тла (*Siracusa u cap., 2008*). Циљ биопластике је имитација животног циклуса биомасе, односно производња CO<sub>2</sub> и воде (**Слика 2.3.**). Брзина разградње зависи од температуре, влажности, броја и врсте микроорганизама. До брзе разградње долази само ако су присутна сва три захтева.



**Слика 2. 3.** Животни циклус биопластике (Siracusa и сар., 2008; [www.european-bioplastic.org](http://www.european-bioplastic.org))

Тренутно биопластика чини само 1 % од укупно 368 милиона тона пластике која се производе на годишњем нивоу. Међутим, како потражња расте, такође расте и тржиште врло динамично, а предвиђа се и значајан пораст до 2025. године ([www.european-bioplastic.org](http://www.european-bioplastic.org)).

Биополимерни амбалажни материјали у прехранбеној индустрији се могу користити у два облика, као премази и као филмови. У случају када се користе као премази, филмогене суспензије се наносе на производе различитим поступцима, као што су техника распршивања, прскања, потапања или четкања. Након тога, ове поступке обично прате кораци сушења водених премаза или хлађење премаза на производу (Debeaufort и сар., 1998). Тако да омотачи представљају зависне облике од производа на ком се примењују и чине целину са њим.

Када су у питању биополимерни филмови, они представљају независне структуре, који се добијају након сушења филмогене суспензије, односно уклањања растварача, и одвајања добијеног филма. Технике које се користе за добијање биополимерних филмова, обухватају екструзију, бризгање дувањем, обликовање дувањем под притиском или коекструдирање вишеслојних филмова, ламинирање, обликовање и углавном сушење на

ваљку ради уклањања растварача из раствора полимера (*Cuq u cap., 1998; Debeaufort u cap., 1998*).

### **2.2.1. Подела биополимера и биополимерних амбалажних материјала**

Основна подела биополимерних филмова је на основу порекла сировине, односно биополимера, који се користи за њихово добијање. Биополимери, као основни конституенти биополимерне амбалаже, се према свом пореклу и начину производње могу поделити у три основне категорије (*Popović, 2013; Lazić u Popović, 2015*):

1. Биополимери произведени класичном хемијском синтезом од биомономера.
2. Биополимери добијени директно из природних или генетички модификованих микроорганизама.
3. Биополимери директно екстраховани из биомасе.

Најширу и најраспрострањенију групу, услед велике доступности сировина за њихово добијање, чине биополимери директно екстраховани из биомасе. Ови биополимери се добијају од биљног или животињског материјала, а у зависности од сировине из које се добијају, могу се поделити на липиде, полисахариде, протеине, а биополимерни материјали на липидне материјале, протеинске, полисахаридне материјале и композитне биополимерне материјале (*Popović, 2013; Lazić u Popović, 2015*).

#### **Подела биополимерних материјала на основу биополимера који су директно екстраховани из биомасе**

##### **Липиди и липидни биополимерни амбалажни материјали**

Липиди су се вековима користили као омотачи за заштиту различитих производа. Међутим, њихов највећи недостатак је немогућност формирања кохерентних независних филмова, док су формирано омотачи обично непрозирни и нефлексибилни. Њихов највећи значај огледа се у њиховој хидрофобној природи, што омогућава добра баријерна својства, посебно према воденој пари, и заштиту производа од губитка влаге. Поред тога, липидни слој на производу може побољшати његов површински сјај.

Још одавнина су се користиле различите врсте воскова директним наношењем на производе, најчешће на воће, како би се спречио губитак влаге и како би се, из естетских разлога, постигла сјајна површина. Ова употреба се користи и дан-данас. У комерцијалне сврхе, као омотачи за свеже воће и поврће, примену су нашли пчелињи восак, карнауба

восак, канделила и парафин. Док су неки воскови нашли и комерцијалну употребу за паковање сира. Истраживања су показала да поједини липиди могу да формирају заштитне филмове на производима који имају вредности пропустљивости водене паре упоредиве са неким синтетским полимерним материјалима, као што су полиетилен мале густине или поливинилхлорид (*Pérez-Gago u Rhim, 2014*).

### **Полисахариди и полисахаридни биополимерни амбалажни материјали**

Полисахариди и њихови деривати се широко користе у производњи биополимерних амбалажних материјала. Карактеришу их добра филмогена својства, баријерна својства према гасовима и ароми, добра механичка својства и способност инкорпорирања активних компоненти у матрикс филма, у циљу добијања активних амбалажних материјала. Међутим, највећи недостатак полисахаридних амбалажних материјала, који уједно и ограничава њихову употребу, је њихова хидрофилна природа и већа осетљивост на влагу и воду, као и лошија баријерна својства према воденој пари (*Popović u сар., 2018*). Најчешће коришћени и највише испитивани биополимери на бази полисахарида за добијање амбалажних материјала, као и неке од њихових особина и особина добијених материјала, дате су у наставку.

**Скроб** је природни полимер који се већ годинама изучава и користи за добијање биополимерних материјала. Скробни филмови су прозирни, без укуса и мириса, због чега налазе широку примену за паковање различитих прехранбених производа јер не утичу на њихова сензорска својства, а и неутралног су изгледа (*Chiumarelli u Hubinger, 2012*). Осим тога, карактерише их мала пропустљивост за гасове. Биополимерни филмови на бази скроба нашли су употребу за прављење пољопривредних фолија, врећа за смеће и производа за домаћинство, као што су посуде за једнократну употребу, шоље и сламчице.

**Хитозан** је природни биополимер који се састоји од линеарне 2-амино-деокси- $\beta$ -D-глукозе повезане 1,4 гликозидним везама, добијен делимично деацетилованим дериватом хитина (*Zhang u сар., 2014a*). Деацетиловани хитозан има слободне аминок групе, које се наелектришу позитивно у киселој средини. Ова особина доприноси растворљивости хитозана у воденим растворима киселина и омогућава коришћење хитозана и његове биоактивности. Међутим, физичко-хемијска својства, као што су чистоћа, вискозност, молекулска тежина, кристална структура и биолошка активност хитозана, углавном зависе од производног процеса и својстава хитина (*Hromiš, 2015*). Хитозан је комерцијално доступан из обновљивих извора и због своје нетоксичности, биоразградивости, биокомпатибилности, биофункционалности и антимикуробне активности има потенцијално широку примену у паковању хране. Иако су биофилмови на бази хитозана компактни и флексибилни, са добрим механичким својствима, осетљиви су на влажност околине и

представљају лошију баријеру за влагу, што ограничава њихову употребу (Porović *u cap.*, 2018).

**Целулоза** је главна структурна компонента у ћелијским зидовима биљака. Биополимерни филмови на бази целулозе углавном се добијају од модификоване целулозе, што подразумева замену хидроксилних група ацетатним или метил функционалним групама. Најчешће коришћени целулозни деривати су метилцелулоза, хидроксипропил целулоза, хидроксипропил-метилцелулоза и карбоксиметилцелулоза. Сви ови деривати целулозе могу формирати биополимерне филмове добрих баријерних својстава према кисеонику, али, као и остали полисахардини филмови, имају слабију баријеру према води. Добијени филмови имају оптимална механичка својства, отпорни су на уља и масти, флексибилна, прозирна, без укуса, боје, мириса. Могу се користити за паковање различитих прехранбених производа, посебно воћа и поврћа (Zhang *u cap.*, 2014b; Porović *u cap.*, 2018).

**Карагенан** је линеарни сулфатни полисахарид, са великим, флексибилним молекулима, који формирају спиралну структуру, која им даје способност да формирају псеудопластичне геле. Користе се као средство за згушњавање у прехранбеној индустрији. У литератури ће се много чешће наћи њихова примена као омотачи (Campos *u cap.*, 2011), или у комбинацији са неким другим биополимерима ради добијања филмова, док је много ређа њихова примена као независни биополимерни филмови (Porović *u cap.*, 2018).

**Алгинати** су полисахардини полимери који се врло често користе за добијање биополимерних филмова услед њихове нетоксичности, биоразградивости, биокомпатибилности и ниске цене (Vu *u Won*, 2013). Добијени филмови су јаки и крхки, са лошим баријерним својствима према води и влаги. Имају способност формирања иреверзибилне реакције са поливалентним катјонима метала (јони калцијума) и могу да произведу у води нерастворљиве полимере (Blanco-Pascual *u cap.*, 2014). Најчешће коришћени филмови су на бази натријум-алгината, који формира филмове растворљиве у води, јаким механичких својстава, без укуса, мириса, флексибилне, слабе пропустљивости за кисеоник и уља (Zahedi *u cap.*, 2010).

**Агар** је полисахарид изолован из црвених алги. Формира гелове снажних структура, које карактерише знатно виша тачка топљења од температуре формирања гела (Natrajan *u Sheldon*, 2000).

**Пектин** чини група полисахарида. Под одређеним условима формирају геле, који се користе у различите сврхе. Са физичко-хемијске тачке гледишта, пектин је анјонски полиелектролит, па јонске интеракције имају велики утицај на његова својства приликом добијања филмова (Vartiainen *u cap.*, 2014).

## Протеини и протеински биополимерни амбалажни материјали

Протеини представљају велику групу природних макромолекула састављених од аминокиселина повезаних пептидним везама. Због присуства неколико различитих бочних група, повезаних са атомом угљеника, аминокиселине стварају велики број протеина, различитих величина, структуре и функције. На основу порекла, протеини се деле на *биљне* (глутен, зеин, соја, грашак) и *животињске* (казеин, сурутка, колаген и кератин). Протеини су врло погодни за добијање биополимерног материјала чије се особине могу подесити физичким, хемијским и ензимским модификовањем, како би се добио материјал са одређеним својствима за паковање различитих производа (*Bourtoom, 2008*). Због својих добрих својстава, посебно добре баријере за гасове и оптималних механичких својства, протеински биополимерни материјали имају велики потенцијал за паковање хране. Међутим, њихов претежно хидрофилни карактер резултира лошим баријерним својствима према воденој пари. Комбинацијом протеина са другим биоматеријалима или биополимерима, може се смањити осетљивост на влагу (*Letendre u cap., 2002*). Добијени протеински филмови су ломљиви али се ова особина може побољшати додавањем компатибилних пластификатора чиме се побољшава растегљивост и еластичност филмова (*Brault u cap., 1997*). Најчешће коришћени и највише испитивани биополимери на бази протеина за добијање амбалажних материјала, као и неке од њихових особина и особина добијених материјала, дате су у наставку.

**Казеин** је протеин који се добија из млека. Услед велике способности повезивања водоничним везама, биофилмови на бази казеина се могу добити лако из водених раствора, без потребе за даљим третманом. Добијени филмови су непрозирни и неутрални, услед чега налазе значајну примену за паковање хране (*Popović u cap., 2018*).

**Протеини сурутке** су протеини који остају након коагулације казеина, током производње сира, и представљају мешавину неколико појединачних протеина:  $\beta$ -лактоглобулин,  $\alpha$ -лакталбумин, албумин говеђег серума и имуноглобулини (*Kinsella, 1984*). Лако се обрађују и са одређеним модификацијама могу да се користе као премази како би се смањила осетљивост на влагу, а њихова употреба као биополимерни филмови је већ испитивана у многобројним литературним наводима (*Jooyandeh, 2011; Ramos u cap., 2012; Schmid u Müller, 2019*).

**Колаген** је флексибилан полимер, али се због сложене и спиралне структуре влакана тешко разграђује и захтева одређени третман. Представља најискоришћенију сировину за добијање биополимерних материјала. Филмови колагена представљају одличну баријеру за кисеоник, при 0 % релативне влажности, али баријера опада са повећањем влажности околине. Да би се побољшале механичке особине филма, смањила растворљивост и



побољшала термичка стабилност филмова на бази колагена, могуће су различите методе умрежавања помоћу хемијских средстава (*Lacroix и Vu, 2014*).

**Желатин** је протеин добијен делимичном разградњом колагена и захваљујући широкој распрострањености, показује велики потенцијал за производњу биополимерних филмова. Желатински филмови су прозирни, чврсти и непропусни за кисеоник. Желатин формира терморевверзибилне филмове, са тачком топљења близу телесне температуре, што је посебно важно у производњи биополимерних филмова за фармацеутску употребу (*Wittaya, 2012*). Биополимерни премази и филмови на бази желатина имају релативно ниску пропустљивост кисеоника, влаге и уља (*Porović и сар., 2018*).

**Глутен** се састоји од две групе протеина: гиладина и глутенина (*Wieser, 2007*). Материјали за паковање биополимера на бази глутенина имају сјајну површину (попут пропилена) и добру отпорност на воду, у одређеним условима. Да би се побољшала својства филма на бази глутенина, може се користити ковалентно умрежавање полипептидних ланаца гиладина помоћу диалдехида и термичка обрада филмова за ливење (*Gao и сар., 2006*).

**Сојини протеини** су комерцијално доступни у облику сојиног брашна, концентрата соје и изолата соје, који се разликују у количини садржаја протеина. Припрема биополимерних филмова на бази сојиних протеина укључује растварање протеина у киселом или алкалном медијуму јер сојини протеини нису растворни у води, али филмови добијени у алкалном медијуму имају боље карактеристике. Температурна обрада током припреме филмова побољшава механичка својства захваљујући бољем умрежавању појачаном након денатурације (*Park и сар., 2002*).

**Протеини зеина** су растворљиви у алкохолу. Зеин је богат неполарним аминокиселинама, што може допринети смањеној осетљивости зеинских филмова према води и влаги, и бољим својствима баријере према воденој пари. Биополимерни филмови на бази зеина показују велики потенцијал за употребу као амбалажни материјали, захваљујући својој способности топлотног заваривања и формирања варова (*Porović и сар., 2018*).

**Протеини тикве** су главна компонента (62 %) семена тикве. Као богат извор протеина, погача која остаје након цеђења уља из семена тикве, може се користити као сировина за развој различитих нових производа која имају велику хранљиву вредност и фармаколошка својства. Према неким истраживањима, протеини и пептиди семена тикве поседују и антиоксидативну активност (*Vaštag и сар., 2010; Vaštag и сар., 2011*). Протеини из семена тикве могу се користити као структурна компонента биополимерних филмова. Ови протеини могу успешно да формирају биополимерне материјале, са одличним

баријерним својствима према гасовима и антиоксидативном активности (*Porović и сар., 2018*).

### **Композитни биополимерни амбалажни материјали**

Композитни материјали представљају биополимерне материјале који се састоје од два или више биополимера. Производња композитних филмова обухвата различите облике хемијске модификације биополимерних материјала, које се могу поделити на: полисахарид/протеин, полисахарид/липид или протеин/липид, а све у циљу добијања нових биополимерних материјала са побољшаним својствима (*Porović и сар., 2018*). Комбинација полисахарида и протеина у циљу добијања биополимерних материјала са побољшаним својствима се врло често користи и изучава. Липидне компоненте се најчешће додају у протеинске или полисахаридне материјале у циљу побољшања баријерних својстава према воденој пари и смањења осетљивости материјала према води и влаги. Липидна компонента може бити унутар добијеног материјала заједно формирајући емулзију, или засебан слој формиран на површини биополимерног филма (ламинарни филмови). Главни недостатак ламинираних филмова је техника припреме, која захтева четири фазе, две за изливање и две за сушење. Због тога ламинирани филмови немају широку примену у прехранбеној индустрији, упркос својим добрим заштитним својствима према воденој пари (*Limpisophon и сар., 2010*). Припрема филмова на бази емулзије обухвата једну фазу изливања и сушења, али добијени филмови имају лошије баријерне особине према воденој пари у поређењу са ламинираним филмом, јер молекули воде још увек имају могућност продирања кроз нелипидну фазу. Разлог томе је нехомогена дистрибуција липида унутар биополимерног материјала. Предност ових филмова су боља механичка својства, поред мањег броја корака неопходних за припрему (*Porović и сар., 2018*). Поред инкорпорирања липидних компоненти у циљу смањења осетљивости материјала на влагу, липидне компоненте са израженом биолошком активносту (антиоксидативном и антимикробном) се додају у циљу добијања активних амбалажних материјала.

### **Композитни биополимерни амбалажни материјали добијени из нуспроизвода агро-индустрије**

Данас један од најважнијих изазова за пољопривреду и прехранбену индустрију је велики пораст свестке популације, и обезбеђење довољне количине хране. Производња пољопривредних производа и њихова употреба за производњу хране доводе до стварања и нагомилавања значајних количина органског материјала, који се зову агро-отпад. У зависности од савремених концепата одрживог развоја и заштите животне средине, индустријска производња као крајњи циљ има максимално коришћење свих ресурса и

практичну производњу без икаквог расипања. На овај начин, истовремено су смањене потребе за сировинама и изворима енергије. Одређена количина агро-отпада сматра се нуспроизводима, али чак и ови нуспроизводи тренутно нису довољно искоришћени. Трендови и потенцијална решења углавном су усмерени на производњу биогорива и сточне хране, као и на изоловање вредних компонената (протеина, полисахарида, фенола итд.). Обзиром да су ови нуспродукти из агро-индустрије често врло богати различитим биополимерима, њихово искоришћење за производњу биополимерних амбалажних материјала може значајно допринети опоравку и искоришћењу органског агро-отпада (Popović *u sar.*, 2018).

Са економског и еколошког становишта, посебно су занимљиви композитни биофилмови добијени директно из нуспроизвода агроиндустрије. На овај начин проблем отпада и одлагања нуспроизвода агроиндустрије може се решити претварањем у корисне производе. Када је у питању прехранбена индустрија добијања уља, након добијања уља из семена уљарица, пресовањем уљаних семенки без употребе органских растварача, и могућег штетног утицаја по здравље људи, остају нутритивно вредни нуспроизводи који се називају *погаче*. Обзиром на њихов састав (висок садржај протеина и полисахарида, а и липида у мањем проценту), ови материјали представљају потенцијалне супstrate за добијање еколошки прихватљивих материјала на бази биополимера.

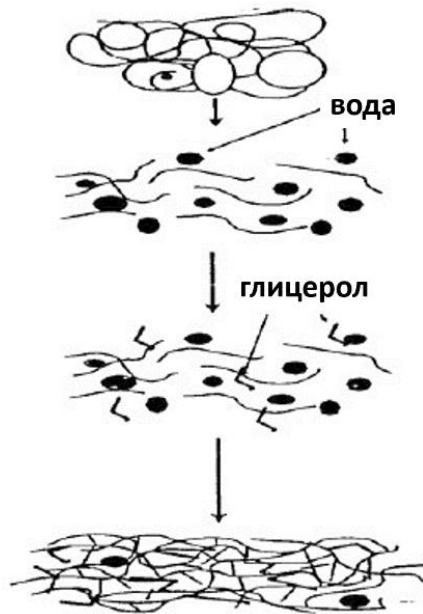
### 2.2.2. Добијање биополимерних амбалажних материјала

За добијање биополимерних филмова на бази протеина и полисахарида може се корисити влажни и суви поступак.

Влажни поступак започиње растварањем састојака у адекватном растварачу, а завршава се уклањањем течне фазе сушењем. Процес добијања биополимерних филмова обухвата три фазе које су приказане на **Слици 2.4.** (Lazić *u Popović*, 2015).

- **Фаза 1:** Растварање и/или денатурација – подразумева раскидање интермолекулских веза (ковалентних и нековалентних) које стабилизују полимерну структуру у нативној форми, коришћењем физичких метода (растварање или термички третман) и/или хемијских агенаса, при чему пролимерни ланци постају мобилни.
- **Фаза 2:** Агрегација и оријентација полимерних ланаца у жељену форму.
- **Фаза 3:** Формирање нових интермолекулских веза које стабилизују тродимензионалну структуру филма. Структура се стабилизује хидрофобном интеракцијом, водоничним везама, дисулфидним везама, итд.. Операција

образовања матрикса филма подразумева примену третмана супротног од оног у фази 1, односно испаравање растварача, хлађење и умрежавање.



**Слика 2. 4.** Механизам формирања биополимерних филмова (Chinabhark, 2005)

Влажни поступак или процес разливања (*casting method*) је поступак који се најчешће примењује за добијање филмова на лабораторијском нивоу. Погодним растварачем и на повишеној температури се нарушава природна структура биополимера и на тај начин добија раствор погодан за формирање филма (*Embuscado u Huber, 2009*). Филмогени раствор се, у дефинисаној маси, разлива на неадхезивну нивелисану подлогу у униформној дебљини, након чега се филм суши при амбијенталним условима или примењујући убрзано сушење (виша температура, вакуум сушење). Раствор полимера формира филм кроз већи број фаза. Када се раствор полимера нанесе на неку површину, захваљујући кохезионим силама, формирају се везе између молекула полимера. Када су кохезионе силе између молекула релативно јаке, формира се належућа континуална површина полимерног материјала. Срастање належућег слоја полимера се дешава због дифузије. Током испаравања растварача напредује процес гелирања и омогућава полимерним ланцима да се поређају довољно близу један другог да би формирали следећи полимерни слој. Када постоји адекватна кохезиона атракција између молекула, довољна дифузија и потпуно испарење растварача, полимерни ланци се ређају тако да оформе филм. Након сушења, филмови се скидају са подлоге, кондиционирају и тестирају или употребљавају у жељеној форми (*Hromiš, 2015*).

У сувом поступку, као што је екструзија, материјал се меша са мањом количином течности и температура материјала у екструдеру се повећава изнад температуре прелаза у стакласто стање. У овој тачки материјал се трансформише из чврсте фазе у растоп уз повећање мобилности. Материјал се затим испушта кроз млазницу и сече у одређене облике. Суви поступак се углавном користи за производњу филмова на полу-комерцијалном и комерцијалном нивоу (Hromiš, 2015).

### 2.2.3. Карактеризација биополимерних амбалажних материјала

Као што је већ раније споменуто, да би се неки амбалажни материјал могао користити за формирање различитих амбалажа и паковање широког спектра производа, није довољно да испуњава само еколошке прохтеве. Основни услов примене амбалаже за паковање прехранбених производа је њена здравствена исправност, која проистиче из основне улоге амбалаже, да треба да штити упаковани производ, а не да га контаминира. Осим здравствене исправности за примену су битне димензионе, физичко-механичке, физичко-хемијске, структурне, баријерне али и еколошке карактеристике (Lazić u Novaković, 2010). Синтетски материјали, због својих одличних својстава и могућности комбиновања у циљу решавања недостатака мономатеријала, као и услед економске исплативости, представљају водеће материјале у свету. Међутим, њихов еколошки проблем проузроковао је масовна истраживања у потрази за одговарајућим алтернативним решењима и амбалажним материјалима, што је довело до појаве биоразградиве амбалаже и биополимерних амбалажних материјала. Овакви материјали су још увек у фази истраживања, управо због својих особина, које су сличне особинама синтетских полимера, али још увек далеко од могућности њихове потпуне замене.

Да би се омогућила успешна примена и предвидело понашање амбалажних материјала током паковања, дистрибуције и складиштења, потребно је извршити њихову карактеризацију. Основна карактеризација амбалажних материјала подразумева одређивање њихових физичко-механичких, физичко-хемијских, баријерних, структурних и биолошких својстава (Hromiš, 2015).

#### Физичко-механичке особине

Од физичко-механичких својстава биополимерних материјала, највише изучаване и од велике важности су дебљина, затезна јачина (енг. *tensile strength*) и издужење при кидању (енг. *elongation at break*).

**Дебљина филмова** представља особину која директно утиче на остале особине биополимерних амбалажних материјала, на његову потенцијалну примену и одрживост упакованог производа. Најчешће се одређује директним мерењем дебљине филма на различитим местима, помоћу микрометра. Приликом додатка различитих активних компоненти у циљу добијања активне амбалаже, често дође до повећања њихове дебљине, јер дебљина филма при разливању исте масе/запремине филмогеног раствора расте са порастом количине растворених супстанци (*Amankwaah, 2013; Rubilar u cap., 2013*).

**Механичке особине** утичу на избор и потенцијалну примену биополимерних филмова. Механичка отпорност углавном подразумева затезну јачину и издужење при кидању, која указују на својства материјала приликом транспорта, руковања и складиштења. Механичка својства биополимерних филмова зависе од структуре полимерних ланаца, кохезије полимерног матрикса, интеракције адитива и матрикса, начина производње филма и присуства пластификатора (*Шупут, 2016*).

**Затезна јачина** представља максималан стрес, напрезање које материјал може да поднесе до тренутка кидања. **Издужење при кидању** представља максималну промену у дужини узорка (издужење) пре кидања.

Када су у питању механичка својства биополимерних амбалажних материјала, на њих могу утицати многи фактори, пре свега састав филма, тј. избор биополимера који се користи за производњу, површински активне супстанце, пластификатори и адитиви, и њихови релативни удели и интеракције, као и услови припреме као што су температура, рН, хомогенизација, услови сушења и складиштења (*Pires u cap., 2011; Xu u cap., 2019*).

Већина биополимерних материјала на бази протеина и полисахарида, због присуства великог броја реактивних бочних ланаца, формирају крте и круте филмове услед интензивног процеса умрежавања. Механичке особине могу бити побољшане додатком пластификатора. **Пластификатори** представљају хидрофилне супстанце, мале молекулске масе који показују велики пластификујући ефекат на полимерни систем, и привлаче молекуле воде, да би се као резултат добиле интеракције између пластификатора и биополимера уместо између самих биополимера. Ове супстанце смањују напон деформације, тврдоћу, густину, вискозитет и електростатички набој полимера. Код биополимера, додаток пластификатора умањује број интермолекулских водоничних веза између молекула полимера, повећавајући флексибилност и покретљивост ланаца. Они се додају са циљем смањења кртости и избегавања појаве скупљања филма током сушења и складиштења. Са додатком пластификатора често долази и до других промена у филму где, поред опадања затезне јачине може доћи до повећања пропустљивости баријере за гасове и водену пару. Зато се жељене карактеристике биополимерног филма могу постићи успостављањем равнотеже између степена умрежености и пластификације полимера.

Глицерол је пластификатор са најширом применом јер позитивно утиче на механичке особине, али и транспарентност биополимерних филмова, као и због своје стабилности и компатибилности са хидрофилним биополимерним ланцима (*Fernandez Cervera u cap., 2004*). Хидроксилне групе, присутне у глицеролу, су одговорне за интер и интрамолекуларне интеракције (водоничне везе) у полимерним ланцима, обезбеђујући филмовима флексибилнију структуру (*Souza u cap., 2012*). Вода представља универзални природни растварач, који пластицизира и/или антипластицизира филмове, у зависности од апсорбоване количине на матрикс филма. Поред глицерола за синтезу филмова користе се и полиоли (етилен гликол, полиетилен гликол, пропилен гликол, сорбитол, манитол и ксилитол), неки моно-, ди- и олигосахариди, липиди и њихови деривати.

### Физичко-хемијске особине

Физичко-хемијске особине, садржај влаге, укупна растворљивост и бубрење амбалажних материјала се односе на њихову осетљивост према води и влаги, и представљају једну од највећих изазова са којом се наука и индустрија суочавају када су у питању биополимерни (протеински и полисахаридни) амбалажни материјали, услед њихове хидрофилне природе. Хидрофилни полимери садрже поларне групе које омогућавају формирање водоничних веза, и могућност апсорпције воде из ваздуха или из прехранбеног производа са којим су у контакту. У зависности од воде која је везана за матрикс биополимерног филма, односно од **садржаја влаге**, зависиће и његове особине. Истраживања су показала да додаток пластификатора у филмогени раствор приликом продукције материјала, утиче на повећање садржаја влаге добијеног филма, а ово повећање пропорционално расте са концентрацијом додатог пластификатора. Са друге стране, додаток хидрофобних компоненти, као што су липиди, уља, етарска уља, воскови могу утицати на смањење садржаја влаге добијених биополимерних филмова, услед смањене доступности поларних група које могу да везују воду (*Popović, 2013; Hromiš, 2015*).

**Укупна растворљивост** такође представља врло важну особину биополимерних филмова. Високомолекуларни протеини у филму су нерастворни или незнатно растворни у води па се од њих могу произвести водоотпорни биоразградиви филмови. Нискомолекуларни протеински ланци, мономери и кратки пептиди, који настају приликом разарања нативних протеина, имобилизовани су у структуру филма или везани водоничним везама и чине протеинску компоненту која се раствара у води. Деловањем услова спољашње средине, као што су кисеоник, температура, вода и микроорганизми, комплетна структура филма може бити нарушена, а тиме и цео матрикс филма може прећи у растворно стање. Умрежавањем молекула физичким, ензимским и хемијским поступцима, може се знатно редуковати растворљивост компоненти биоразградивог филма (*Popović, 2013; Hromiš, 2015*).

**Бубрење** такође представља врло важну физичко-хемијску особину биополимерних материјала. Овај процес се најчешће одвија када материјал доспе у контакт са молекулима компатибилног растварача. Када су у питању биополимери, већина представљају у води растворне полимере, па је управо вода компатибилан растварач и често се користи за добијање ових биополимерних материјала. У контакту са биополимерним материјалима, поларни молекули воде бивају привучени хидрофилном површином филма, а потом и дифундују у сам матрикс, везујући се за поларне групе у њему (*Lazić u Popović, 2015*).

### Баријерне особине

**Пропустљивост амбалажних материјала за гасове и водену пару** представљају два основна баријерна својства, чије одређивање је од великог значаја у примени материјала за процену одрживости упакованог производа. Садржај кисеоника у амбалажи је основни фактор који покреће процес липидне пероксидације иницирајући ланац деградирајућих реакција, нарушавајући притом и органолептичка својства производа. Пропустљивост материјала за угљендиоксид такође има велики значај у продужавању одрживости производа. Посебан значај је код производа пакованих у модификованој атмосфери, које представља савремен метод паковања где се ваздух изнад производа замењује смешом гасова, најчешће  $O_2$ ,  $CO_2$  и  $N_2$  одређених концентрација, а угљендиоксид се користи због инхибиторног деловања на аеробне микоорганизме, могуће узрочнике квара (*Hromiš, 2015*).

Поред физичко-хемијских особина, **брзина пропустљивости водене паре** представља још једну особину материјала која је директно у вези са осетљивости биополимерних филмова према води, влаги и воденој пари. Једна од главних карактеристика амбалажног материјала је да смањи или онемогући пренос влаге између упаковане намирнице и околине која је окружује, како би се заштитио производ и успорило његово кварење. Биополимерни амбалажни материјали су најчешће хидрофилни са поларним групама у молекулској структури, што значајно утиче на њихову баријеру према воденој пари, и показују значајно веће резултате у поређењу са синтетским материјалима (*Abdelhedi u cap., 2018*). Велика пропустљивост водене паре може бити главни недостатак неког амбалажног материјала за паковање одређеног прехранбеног производа, посебно оних намирница које имају велики садржај влаге.

Истраживања су показала да се пропустљивост водене паре одвија кроз хидрофилне делове филма, и да је директно зависна од односа хидрофилних и хидрофобних делова у филму (*Hernández-Muñoz u cap., 2004*). Из тог разлога, повећање хидрофобних делова у филму, односно инкорпорирањем хидрофобних/липидних компоненти у матрикс филма, могло би смањити пропустљивост водене паре биополимерних материјала, јер се повећава



хидрофобност филма. Међутим, додаток хидрофобне компоненте не гарантује смањење брзине пропустљивости водене паре јер пропустљивост зависи и од постојања пора, шупљина, пукотина и канала у филмовима који олакшавају транспорт, нпр. молекули воде (*Cheng и сар., 2008*).

Поред пропустљивости водене паре, веома важна особина амбалажних материјала, у циљу заштите хране од оксидације, је **пропустљивост светлости** (*Abdelhedi и сар., 2018*). Баријерна својства амбалажних материјала на пропустљивост светлости, представља врло важан фактор за одрживост и квалитет упакованог производа. У контакту са производом, светлост може да катализује оксидацију липида и масних киселина и да доведе до ужелости производа, односно до настанка непожељног укуса и мириса. Осим видљивог дела спектра, амбалажни материјали морају да имају и баријеру према UV светлости, будући да излагање фотосензитивних прехранбених производа UV светлости може довести до оксидације, губитка хранљивих материја и настанка непријатних мириса и укуса (*Han и сар., 2018*). Истраживања су показала да управо овај део зрачења је одговоран за највећи број иницираних биохемијских и фотооксидативних промена квалитета унутар упакованог садржаја. UV зрачење је краћих таласних дужина које имају већу енергију зрачења од видљивог дела светлости (*Hromiš, 2015*).

На баријеру пропустљивости светлости биополимерних филмова, највише утиче природа полимера, оптичке карактеристике површине биоразградивог филма, боја, сјај и прозирност.

### Структурне особине

Најчешће примењиване технике за проучавање структурних својстава биополимерних материјала подразумевају (*Porović, 2013*):

- Фурије трансформишућу инфрацрвену спектроскопију (енг. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy – FTIR*);
- Електрон скенирајућу микроскопију (енг. *Scanning Electron Microscopy - SEM*);
- Диференцијална скенинг калориметрија (енг. *Differential Scanning Calorimetry - DSC*);
- Термо-механичка анализа (енг. *Thermo-Mechanical Analysis - TMA*);
- Динамичко-механичка анализа (енг. *Dinamic-Mechanical Analysis - DMA*).

**Фурије трансформишућа инфрацрвена спектроскопија (FTIR)** представља корисну технику за праћење структурних промена на молекуларном нивоу узорака, као и за одређивање микроструктурних карактеристика биополимерних филмова, посебно композитних јер се помоћу ове методе могу одредити постојеће везе у матриксу филма

(*Embuscado u Huber, 2009; Popović, 2013*). Овом методом се може утврдити и присуство пластификатора, емулгатора и других активних или функционалних компоненти.

FTIR спектроскопија функционише на принципу проласка и апсорпције инфрацрвеног светла, одређене таласне дужине, кроз узорак. Свака компонента филма, као и свака формирана веза, има карактеристичан сет апсорпционих опсега и карактеристичан интерферограм (*Popović, 2013*).

**Електрон скенирајућа микроскопија (SEM)** се користи најчешће за оцену хомогености материјала, структуре, глаткоће површине, дебљине, присутности пора и пукотина. Ова метода може дати информације о површинској микроструктури и попречном пресеку филма (*Popović, 2013; Hromiš, 2015*). Осим оцене хомогености материјала, SEM метода се може користити и за одређивање пречника и униформности честица или капљица, које настају унутар филма након инкорпорирања активних компоненти у циљу добијања активних амбалажних материјала.

### **Биолошке особине**

Као што је већ споменуто на почетку, основна улога амбалаже је да заштити упаковани производ од момента паковања до његове употребе. Суштина је да квалитет производа остане исти што дуже времена током складиштења. Поред амбалаже која је ту да одржи квалитет, примењују се многи поступци конзервисања који треба да пре свега омогуће што дужи рок трајања упакованих намирница. У ове сврхе могу се користити различити конзерванси, синтетски, али и све више природни конзерванси као алтернатива синтетским услед све веће потражње и окретању потрошача ка природним једињењима. Са овог аспекта биополимерни материјали су од посебног значаја, пре свега због њихове особине да се добијају из природних извора, али и потврђене биолошке активности (антиоксидативне и антимикробне). Поред тога, могућност њихове употребе као природни матрикс/носачи активних супстанци даје им предност у односу на синтетске амбалажне материјале.

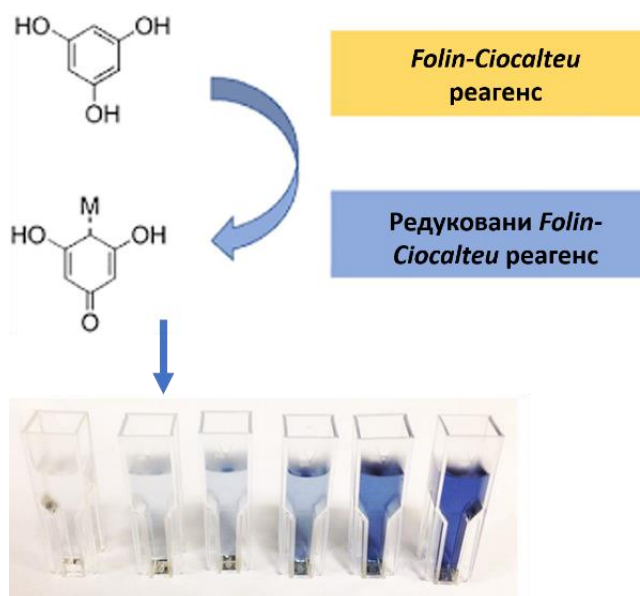
Основни процеси који утичу на кварирање намирница су оксидативни процеси и процеси изазвани микроорганизмима квариоцима хране. Оксидативни процеси су примарни механизми квара низа намирница, обзиром да су слободно-радикалске реакције и пероксидација липида међу главним узрочницима брзог нарушавања сензорских и нутритивних својстава намирница, а потенцијално и извор токсичних једињења у храни. Храна сама по себи представља идеалну подлогу за раст различитих микроорганизама јер поседује све компоненте потребне за њихов раст и размножавање (угљенхидрате, протеине, масти, итд.). Микробиолошки квар, узрокован деловањем ензима микроорганизама, доводи до стварања непожељне промене ароме, боје и текстуре

производа, што као последицу има смањење рока одрживости. Микробиолошка контаминација је један од најчешћих узорка кварења хране, и великог губитка произведене хране и пре њеног конзумирања, односно великог економског губитка, као и настанка различитих обољења код људи услед конзумирања хране контаминираним патогеним микроорганизмима. Годинама је забележен огроман број великих епидемија изазваних тровањем храном широм света узроковане разним грам-негативним или грам-позитивним бактеријама у храни, а неке инфекције, попут људске листериозе, карактерише и висока стопа смртности (*Adams u Moss, 2008*). Иако је већина обрађених намирница, пре испостављања тржишту, термички третирана или поседује сопствену самозаштиту, микробиолошка контаминација се може појавити на површини хране или неком њеном делу приликом оштећења током паковања. Због тога, заустављање или потпуно инхибирање раста различитих микроорганизама је још један важан фактор о ком треба водити рачуна приликом одабира амбалажног материјала за паковање прехранбених производа. Из ових разлога примена активног паковања, у циљу одржавања квалитета упакованог производа и могућности продужетка рока трајања, налази све већи значај.

### Укупан садржај фенола

Фенолна једињења представљају групу хетерогених једињења и једну од најважнијих класа природних антиоксиданата. Сматра се да су водећа једињења са антиоксидативним деловањем и да могу да делују као редукујући агенси, хватачи синглетног кисеоника, антиоксиданти доноси водоника, и имају способност хелирања метала (*Filip, 2014*). Управо из тог разлога приликом одређивања антиоксидативне активности неког једињења, или у овом случају биополимерних материјала, пожељно је урадити и укупан садржај фенола како би се могла предвидети активност испитиваног узорка.

Укупан садржај фенола у биополимерним филмовима најчешће се одређује применом *Folin-Ciocalte* методе. Ова метода се заснива на мерењу редукујућег капацитета полифенолних једињења чијом дисоцијацијом настаје протон и феноксидни анјон. Настали феноксидни анјон редукује *Folin-Ciocalteu* реагенс до плаво обојеног јона (**Слика 2.5.**) (*Vladić, 2017*).



Слика 2. 5. Механизам редукције Folin-Ciocalte реагенса

### Антиоксидативна својства биополимерних материјала

Антиоксиданти подразумевају све супстанце које значајно смањују или спречавају оксидацију неког супстрата (Halliwell *u cap.*, 1995). Њихов значај се пре свега огледа у томе да штите производе од оксидативне деградације. Активност антиоксиданата зависи не само од њихове структуре, него и од многих других фактора, као што су концентрација, температура, светлост, тип супстрата, физичко стање система, као и присуство микрокомпонената које делују као прооксиданти или синергисти.

Антиоксидативна активност биополимерних филмова зависи од многих фактора, пре свега од супстрат који се користи за добијање материјала, услова производње и састава филма, врсте и количине активних агенаса и његовог састава, интеракција између компонената активних агенаса и полимерних ланаца у филму, као и од различитих спољашњих услова (Burt, 2004; Tongnuanchan *u cap.*, 2012; Ruiz-Navajas *u cap.*, 2013).

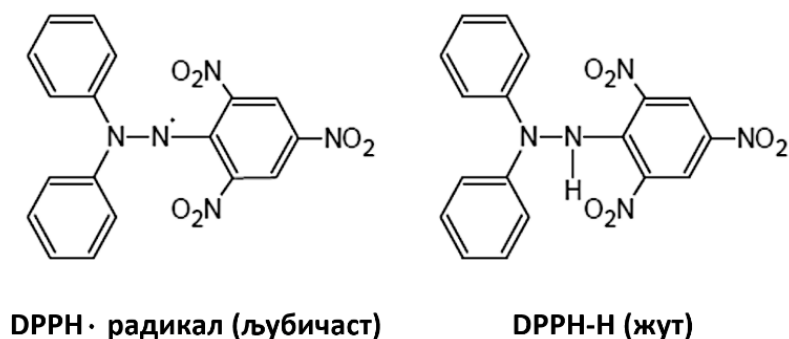
Методe за одређивање антиоксидативног потенцијала у биолошким системима и намирницама могу бити засновани на:

- способности хватања слободних радикала – одређивање капацитета хватања супероксид анјон радикала ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), хидроксил радикала ( $\text{HO}\bullet$ ), пероксил радикала ( $\text{ROO}\bullet$ );
- трансферу електрона – одређивање неутрализације DPPH $\bullet$  радикала, ABTS+ $\bullet$  радикала, одређивање редокс потенцијала – редукциона моћ, и FRAP тест (енг. *ferric ion reducing antioxidant power*);

- инхибицији оксидо-редукционих ензима (липоксигеназа, полифенолоксидаза).

Због великог броја реактивних врста које нарушавају квалитет састојака хране и разноликости механизма њиховог деловања, немогуће је дефинисати јединствено мерило антиоксидативне активности (Hromiš, 2015). На основу различитих литературних података, антиоксидативна активност биополимерних филмова одређена је коришћењем многобројних различитих метода. Примена више од једне методе за одређивање антиоксидативне активности биополимерних филмова је пожељно како би се што боље утврдили механизми деловања биополимерних материјала (Tongnuanchan *u sar.*, 2012; Xu *u sar.*, 2019).

**Способност неутрализације DPPH радикала** је једна од најчешће коришћених метода за одређивање антиоксидативне активности биополимерних филмова. Представља доступну, брзу, једноставну и јефтину методу за одређивање антиоксидативне активности. Најчешће се користи да се испита способност супстанце да делује као „хватач“ слободних радикала или донор водоника. DPPH радикал представља стабилан органски радикал, тамнољубичасте боје, доступан комерцијално. У радикалској форми има апсорпциони максимум на 515 nm захваљујући неспареном електрону, а након редукције апсорпциони пик нестаје. Појава жуте боје објашњава се способношћу појединих компоненти да делују као донори водоника или електрона, при чему DPPH радикал прелази у редуковани неутрални DPPH-H облик (**Слика 2.6**). Због ове појаве, ова антиоксидативна метода се најчешће изводи спектрофотометријски.



**Слика 2. 6.** Радикалска и редукована форма DPPH (Hromiš, 2015)

Хидроксил радикал је изузетно реактиван. Литературни подаци су потврдили да се може створити у намирницама као и да може проузроковати покретање оксидативних промена у храни (Koryuska-Dahl *u Richardson*, 1980). Међутим, **способност неутрализације ОН радикала** није често коришћена метода за одређивање антиоксидативне активности биополимерних филмова, иако би се ОН радикал могао сматрати од веће важности у поређењу са DPPH радикалом, уколико се узме у обзир да је DPPH радикал синтетског

порекла. Највероватније да су разлози томе кратак животни век ОН радикала, као и изузетно висока реактивност, што може ометати његову директну детекцију (Xiang и сар., 2011).

Хидрокси радикал настаје као производ Фентонове реакције ( $\text{Fe}^{2+}$  реагује са водоник-пероксидом, у присуству етилен-диамин-тетрасирћетне киселине). Формирани радикал реагује са деоксирибозом, при чему као производ реакције настаје малондиалдехид, који са тиобарбитурном киселином гради ружичасто једињење. Метода се одређује спектрофотометријски, а апсорбанција се мери на 520 nm (Вукас, 2013).

**Редукциона моћ** неке компоненте указује на њену потенцијалну антиоксидативну активност у виду способности да донира електрон. Што је већа редукциона моћ неког једињења, способност да донира електрон је боља. Најчешће се одређује спектрофотометријски на таласној дужини од 700 nm, а добијена вредност апсорбанце директно је пропорционална антиоксидативној активности, односно редукционој моћи испитиваног једињења.

### **Антимикробна својства биополимерних материјала**

Поред антиоксидативне активности, односно могућности спречавања настанка липидне пероксидације упакованог производа, врло важна биолошка активност биополимерних материјала је и антимикробно својство, односно одлагање или спречавање микробиолошког квара упакованих намирница. Микробиолошка контаминација представља један од најчешћих узрока кварења хране, као и настанка различитих обољења код људи након конзумирања намирница контаминираних патогеним микроорганизмима. Осим тога, микробиолошки раст доводи до промена у текстури, боји, укусу и нутритивним вредностима хране. Ове промене могу довести до стварања хране лошег укуса, мириса и потенцијално здравствено неисправне за људску употребу.

Функција антимикробног паковања подразумева продужетак *lag* фазе и редукције раста микроорганизама како би се продужио рок одрживости уз очување квалитета.

Најчешће коришћена метода за одређивање антимикробне активности биополимерних материјала је **диск-дифузиона метода**.

Диск-дифузиона метода представља квалитативну методу која се заснива на одређивању и мерењу пречника настале зоне инхибиције око испитиваног биополимерног материјала или комерцијалног диска на који се наноси испитивана супстанца. Зона инхибиције представља чисту зону око материјала, где нема раста микроорганизама, и односи се на његову антимикробну активност, односно на способност дифундовања и

испољавања антимикробних активних компоненти из матрикса биополимерног филма у подлогу (*Pranoto u cap., 2005; Hromiš, 2015*).

---

### 2.3. Биополимерни амбалажни материјали на бази погаче уљане тикве голице

---

Семе тикве, *Curcubita pepo* L. представља важну уљарицу у Србији, и широко се користи за производњу јестивог уља (*Vaštag и сар., 2011*). Главни нуспроизвод добијен након цеђења уља из семена тикве хладним пресовањем, представља одмашћена погача уљане тикве голице (PuOC). Овај нуспроизвод је богат протеинима (чак око 63 %), угљеним хидратима, уљима, сировим влакнима и другим компонентама. Због свог хемијског састава, PuOC представља сировину погодну за добијање биополимерних композитних филмова (*Роровић и сар., 2011*). Обзиром да се добија из агро-индустријског отпада, употреба PuOC за добијање биополимерних амбалажних материјала може допринети смањењу отпада у животној средини.

Испитивање састава, својстава, карактеризација и модификација особина, као и примена погаче уљане тикве голице и протеина из погаче, у различитим сферама интересовања, као што су амбалажни материјали, филмогени омотачи у поступку инкапсулације, природни емулгатори, биоактивни пептиди, се изучава последњих 10 година на Технолошком факултету Нови Сад (*Vaštag и сар., 2010; Роровић, 2010; Vaštag и сар., 2011; Роровић, 2013; Вичко и сар., 2015; Вичко и сар. 2016; Љакаревић и сар., 2019*).

Прва примена PuOC код производње биополимерних амбалажних материјала била је 2010. год. када су *Роровић и сар. (2010)* испитивали могућност добијања композитног филма на бази желатина и PuOC, у циљу добијања јефтинијих биополимерних материјала са побољшаним особинама. Највећи допринос додатка PuOC код ових композитних филмова запажен је код механичких особина, где су са повећањем удела PuOC добијени филмови са већом затезном јачином и већим издужењем при кидању. Највеће издужење при кидању композитни филм је показао са уделом PuOC од чак 95 %, и имао је за 20 % веће издужење при кидању у поређењу са филмом на бази чистог желатина. Док су композитни филмови са најбољом затезном чврстоћом добијени када је 40 % желатина замењено са PuOC. Остала својства, физичко-хемијска и антиоксидативна, су била слична или чак побољшана са додатком PuOC у поређењу са чистим биополимерним филмовима на бази желатина. Ови добијени резултати су указали на филмогене способности PuOC и могућност производње амбалажних материјала на бази овог нуспроизвода индустрије уља (*Роровић и сар., 2020*).

Даља испитивања и истраживања обухватила су могућности добијања биополимерних филмова на бази PuOC. *Роровић и сар. (2011)* испитивали су утицај



температуре термичког третмана и рН филмогеног раствора на особине добијених филмова на бази РuОС. Добијени резултати су показали да биополимерни филм на бази РuОС, добијен при температури загревања филмогеног раствора од 90 °С и рН 12 је имао најбоља механичка својства, односно највећу затезну чврстоћу и издужење при кидању, као и најбољу, односно најмању, баријеру према гасовима. Резултати добијени применом SEM микроскопије показали су да ови филмови имају врло компактну структурну површину, на којој су уочене само нано рупе, што највероватније утиче на њихову добру баријеру према гасовима. Поред ових особина, филмови на бази РuОС су показали и антиоксидативну активност, где је филм добијен при условима рН 10 и температури загревања 60 °С, показао најбољу антиоксидативну активност у виду способности неутрализације слободних радикала (Popović *u cap.*, 2020).

Након што је извршена потпуна карактеризација добијених филмова на бази РuОС (механичка, физичко-хемијска, баријерна, структурна и биолошка својства), даља истраживања су била усмерена на могућност формирања амбалаже, односно кесица, на бази РuОС материјала. Обзиром да РuОС филмови немају могућност топлотног заваривања, односно формирања варова, истраживања су прво била усмерена на формирање композитних ламинарних биополимерних материјала на бази РuОС и зеина (РuОС/зеин), где је зеински слој пре свега служио за решавање поменутог недостатка амбалажног материјала на бази РuОС, због његове могућности заваривања. Добијени материјали су оптимизовани и окарактерисани, у циљу добијања амбалажног материјала са оптималним карактеристикама (Bulut *u cap.*, 2017a; Bulut *u cap.*, 2017b; Bulut *u cap.*, 2017c). Испитане су механичке, физичко-хемијске и структурне особине филмова. Добијени резултати показали су да је зеински слој значајно утицао на РuОС филм. Негативан утицај запажен је код механичких својстава где је дошло до смањења затезне јачине и издужења при кидању ламинарног композитног материјала у поређењу са мономатеријалом на бази РuОС. Позитиван утицај запажен је код физичко-хемијских особина, где је услед хидрофобне природе зеина, ламинирање филма на бази РuОС утицало на његову хидрофилну природу, и довело до смањења осетљивости, односно физичко-хемијских својстава биополимерних материјала на бази РuОС према влаги, поређењем са физичко-хемијским својствима мономатеријала (на бази РuОС и зеина). Утицај различитих концентрација глицерола и гуар-ксантана на ламинарни двослојни филм на бази РuОС и зеина показао је да је оптимална механичка својства имао филм са најнижом концентрацијом глицерола и највишом концентрацијом гуар-ксантана. Сви филмови показали су лошу баријеру за водену пару и одличну баријеру за O<sub>2</sub>, док се са повећањем концентрације адитива (глицерола и гуар-ксантана), повећала и брзина преноса CO<sub>2</sub> (Bulut *u cap.*, 2017a; Bulut *u cap.*, 2017b; Bulut *u cap.*, 2017c).

Након карактеризације добијених ламинарних биополимерних композитних филмова на бази  $PuOC$  и зеина, баријарна својства ових материјала упоређена су са комерцијално доступним високо баријерним материјалима на бази полиамид-полиетилен (PA/PE). Могућност одржавања модификоване атмосфере у кесицама на бази композитних ламинарних биополимерних материјала као и комерцијалних материјала, је такође испитана (*Bulut u cap., 2016*). Као модел производ за паковање коришћен је полутврди моцарела сир. Поређењем добијених резултата показало се да оба материјала имају изврсна баријерна својства према  $O_2$ , док су композитни биополимерни ламинарни материјали на бази  $PuOC$ /зеин показали већу пропустљивост за  $CO_2$ , у односу на комерцијалне PA/PE материјале. Већа пропустљивост  $CO_2$  код амбалажних материјала, може бити предност за паковање неких прехранбених производа, посебно оних које карактерише виша стопа „дисања“, као што је управо сир, производ коришћен као прехранбени модел у датом истраживању.

Иако биополимерни амбалажни материјали добијају на значају пре свега због својих еколошких карактеристика, као што су добијање из природних извора и биоразградња, односно разградња у спољашњој средини услед утицаја различитих спољашњих фактора, управо ове особине утичу и на један од њихових највећих недостатака и ограничења, а то је убрзано старење током времена. Процес старења биополимерних материјала утиче на промене у њиховим особинама, и један је од кључних фактора за њихову примену у паковању хране. *Bulut u cap. (2017a)* су испитивали утицај складиштења на особине дуплекс биополимерних  $PuOC$ /зеин филмова, у току четири недеље. Испитивања су обухватала утицај складиштења на механичка, физичко-хемијска, баријерна својства, као и квалитет формираних варова и састав модификоване атмосфере у формираним кесицама. Добијени резултати су показали да дебљина и затезна чврстоћа дуплекс филмова током три недеље складиштења остају непромењена, након чега се запажа благи пораст. Међутим, издужење при кидању, садржај влаге, укупна растворљивост и бубрење показали су тренд смањења током читавог периода складиштења. Након четири недеље складиштења, дошло је и до повећања брзине преноса  $O_2$  и  $CO_2$  кроз амбалажне дуплекс материјале, као и смањење јачине формираних варова и промене модификоване атмосфере у формираним кесицама. Током четири недеље складиштења, дошло је до повећања садржаја  $O_2$  и до седам пута, у кесицама, међутим садржај  $CO_2$  смањено се до осамнаест пута након недељу дана и остао стабилан током следеће три недеље. Највероватније да слабљење формираних варова током складиштења, као и повећања брзине преноса гаса кроз материјал, су резултат промене садржаја модификоване атмосфере у кесицама.

Сва ова истраживања указују на одлична својства биополимерних материјала на бази  $PuOC$ , која су по много чему упоредива са синтетским полимерним материјалима. Међутим, њихов највећи недостатак огледа се у великој осетљивости на воду и влагу,

односно слабу баријеру према воденој пари, што уједно и ограничава њихову употребу за паковање производа са већим  $a_w$  садржајем. *Porović и сар. (2021)* су покушали да реше овај недостатак формирањем ламинарних амбалажних материјала на бази  $PuOS$  и полиетилена (PE), у циљу добијања новог амбалажног материјала са побољшаним карактеристикама оба мономатеријала, где би PE слој допринео побољшању осетљивости на влагу  $PuOS$  филма, а  $PuOS$  слој допринео побољшању баријере према гасовима PE слоја. Произведени материјал је показао добра баријерна својства према влаги, гасовима и светлости. Као и добру контролу модификоване атмосфере у кесицама формираним од  $PuOS/PE$  материјала.

---

## 2.4. Активни биополимерни амбалажни материјали

---

Традиционално паковање хране већ деценијама се користи за пружање пасивне заштите производима од различитих спољашних услова који утичу на његов квалитет и рок трајања. Нова алтернативна метода је активни систем паковања, који је дефинисан као употреба материјала који ослобађа или апсорбује компоненте у или из хране, како би се одржао квалитет упакованог производа или продужио рок трајања. Активно паковање је иновативан концепт паковања хране, развијен као одговор сталним променама и повећаним захтевима потрошача и тржишта (*Шупут, 2016*), као што су захтеви за повећањем трајности производа и негативан став потрошача према конзервансима (*Хромјиш, 2015*).

Технике активног паковања се могу поделити на (*Лацић и сар., 2008; Хромјиш, 2015; Шупут, 2016*):

- *Апсорпционе системе* који су предвиђени да апсорбују нежељене материје, односно једињења, као што су кисеоник, угљен-диоксид, етилен, влага, лактоза, страни мириси или холестерол.
- *Отпуштајући системи* који су предвиђени да активно додају или емитују једињења у упаковану храну или у слободан простор у амбалажи, као што су угљен-диоксид, антиоксиданси и антимирикобни агенси.
- *Остали системи* могу имати разне задатке, као што су само-загревање, само-хлађење и конзервирање.

Најпознатија и најчешће коришћена технологија активних паковања у индустрији хране су специјална паковања која служе за елиминацију кисеоника из унутрашњости паковања (енг. *oxygen scavenger*). Најчешће се у ову сврху користе бутиловани хидроксианизоли и хидрокситолуени, који мигрирају из паковања у храну и стварају површински антиоксидативни ефекат. Циљ овог паковања је да се спрече, или у највећој мери редукују оксидациони процеси (*Хромјиш, 2015*).

Активне компоненте се могу применити у неколико форми у циљу добијања активног паковања (*Appendini и Hotchkiss, 2002; European Commission, 2004; Шупут, 2016*):

1. Додавање кесица/јастучића, који садрже испарљиве активне агенсе.
2. Инкорпорација активних агенаса директно у полимере.
3. Ослојавање полимерних амбалажних материјала активним средствима.

4. Имобилизација активних средстава у полимере јонским или ковалентним везама.
5. Употреба полимера који по својој природи већ поседују неку активност.

У случају уградње, инкорпорирања активних компоненти у/на амбалажни материјал, може се постићи споро или контролисано ослобађање активних једињења из материјала у простор амбалаже или директно на површину производа током његовог рока употребе (*Ribeiro-Santos u cap., 2017*). Управо овај разлог је искоришћен да се превазиђу проблеми у прехранбеној индустрији који се јављају приликом директне уградње одређених биоактивних или функционалних супстанци у прехранбене производе. Ови проблеми и недостаци директне примене активних једињења код заштите намирница се пре свега односе на могући губитак адитива при њиховом реаговању са различитим компонентама хране, као што су липиди, протеини, полисахариди, итд., поред тога може доћи до природне разградње и губитка активности током времена. Из овог разлога често су потребне веће количине активне компоненте да би њихова активност уопште могла да се испољи, а код многих супстанци већа концентрација може довести до негативног утицаја по здравље људи, или до промене сензорских и органолептичких својстава намирница. Једна од замисли активних амбалажних материјала је да се зид амбалаже користи као резервоар за биоактивна једињења која ће бити или имобилизована или контролисана у унутрашњем паковању прехранбених производа. Одредба Европске Уније о материјалима и предметима који долазе у додир са храном а која је ступила на снагу 2004. године (*European Commission, 2004*), допушта увођење „активне“ и „интелигентне“ амбалаже, док су додатни захтеви прописани специфичним мерама које укључују позитивну листу допуштених супстанци и/или материјала (*Hromiš, 2015*).

Растући захтеви потрошача за храном без хемијских конзерванаса усмерили су многа истраживања у смеру проналажења природних адитива који се могу користити у очувању хране. У овом контексту амбалажа на бази биополимера добија на значају, а природне супстанце са израженим антимицробним и антиоксидативним својствима, као што су етарска уља и природни биополимери, посебно скрећу пажњу (*Hromiš, 2015*). Природни биополимери могу служити као носачи/матрикс активних компоненти, у циљу њиховог постепеног отпуштања у храну током складиштења, а могу и сами показивати активна својства у заштити хране. Овако дизајнирана амбалажа је, поред основне функције производа, активна, природна, еколошки прихватљива и биоразградива.

---

## 2.5. Примена етарских уља код добијања активних биополимерних амбалажних материјала

---

Активне компоненте које се користе код активне амбалаже могу бити природне или синтетске. Потрошачи су све више упознати са здравственим ризицима који носе синтетски адитиви па се све чешће прибегава примени адитива добијених из природних извора (*Bahram u cap., 2012; Amorati u cap., 2013; Шупут, 2016*). Примена етарских уља, као активних агенаса за одржавање и очување квалитета производа и могућности продужетка рока трајања, сматрају се одличном алтернативом за синтетске адитиве и налазе све већу примену (*Atares u Chiralt, 2016; Ribeiro-Santos u cap., 2017*).

Етарска уља представљају секундарне метаболите биљака који се традиционално користе већ годинама као адитиви у прехранбеној индустрији, за продужетак рока трајања различитих намирница. Позната су по својој како антиоксидативној активности тако и антимикробној активности. Етарска уља показују антимикробна и антиоксидативна својства највише због присуства фенолних једињења (*Ćavar Zeljović u cap., 2015; Ribeiro-Santos u cap., 2017*). Етарска уља чине смеше различитих једињења, угљоводоника, алкохола кетона, алдехида, органских киселина, фенола и других, познатих по својим биолошким својствима. Могу да садрже 20 до 60 различитих компоненти у различитом квантитативном односу. Најчешће су две, три компоненте присутне у већем проценту (20-95 %), и представљају главне компоненте етарског уља одговорне за његову активност, али једињења присутна у малом проценту, услед синергистичког деловања, највероватније могу да појачавају деловање основних, најзаступљенијих компоненти (*Bakkali u cap., 2008*). Састав етарског уља је веома варијабилан у једној истој биљци, као што може да варира између различитих примерака исте врсте. Ово зависи од услова средине у којој биљка расте, пре свега климе али и чињенице да већина биљака која се користи за производњу етарског уља, било култивисане или сакупљене у природи, има бројне варијетете, подваријетете, сорте, клонове и хибриде тако да хемијски састав уља може бити поприлично неуједначен услед генетичког диверзитета биљака. На основу досадашњих испитивања, прихваћено је мишљење да је квалитативни састав етарских уља под генетичком контролом, док су варирања у квантитативном садржају компоненти под утицајем спољашњих фактора (*Bakkali u cap., 2008*).

Употреба етарских уља као адитива у циљу продужетка рока трајања прехранбених производа се већ увелико користи, а многа се већ налазе и на листи општепризнатих сигурних супстанци-GRAS (енг. *generally recognized as safe*). Међутим, овај метод поседује одређена ограничења. Додатком етарских уља у намирнице може доћи до јаког утицаја на

њихову арому и органолептичка својства, често врло негативно. Поред тога, обзиром да су етарска уља смеша различитих испарљивих компоненти, управо одговорна за активност етарских уља, ова једињења су врло осетљива и нестабилна, па приликом додатка у намирнице може доћи до њиховог губитка, као и до губитка услед реакција са компонентама хране. Врло често, управо из овог разлога потребно је применити веће количине етарских уља да би се показала ефективним, што утиче и на цену производа. Због тога новији приступ, инкорпорирања етарских уља у амбалажне материјале може превазићи ове проблеме (*Atares u Chiralt, 2016*). На овај начин, може се омогућити примена мање количине етарских уља, смањење утицаја на сензорска својства производа, као и контролисано и успорено ослобађање активних компоненти из материјала на производ, у циљу очувања квалитета производа и могућности продужетка његовог рока трајања.

Етарска уља могу да делују микробиостатски (инхибиција раста) или микробицидно (убијање микроорганизама). Првобитна истраживања биолошке активности етарских уља била су базирана на антибактеријском потенцијалу, док је интересовање за истраживањем антифунгалне активности почело нешто касније.

Механизам антимикуробног деловања етарских уља није утврђен, али су предложени неки механизми могућих деловања:

- Једињења из уља интерферирају са фосфолипидима ћелијске мембране, повећавајући њену специфичну пропустљивост, убрзавајући губитак ћелијских конституената (*Lambert u cap., 2001*).
- Компоненте етарских уља утичу на рад ензимских система ћелије микроорганизама, укључујући оне који учествују у продукцији енергије и синтези структурних компоненти и/или доводе до оштећења генетског материјала ћелије микроорганизама (*Kong u cap., 2010*).
- Механизам антиоксидативног деловања етарских уља или екстракта се испољава захваљујући њиховој способности да прекину ланац реакција слободних радикала донирајући водоников атом (*Georgantelis u cap., 2007; Petrou u cap., 2012*).

Последњих неколико година, истраживања базирана на примени етарских уља у циљу добијања активних биополимерних амбалажних материјала је у експанзији, а преглед неких литературних навода дат је у **Табели 2.1.**

**Табела 2. 1.** Преглед примене етарских уља код активних биополимерних амбалажних материјала (Atares и Chiralt, 2016; Ribeiro-Santos и сар., 2017)

БИОПОЛИМЕР	ЕТАРСКО УЉЕ	АКТИВНОСТ	ПРОИЗВОД	ГЛАВНИ РЕЗУЛТАТИ	РЕФЕРЕНЦА
Скроб	Цимет Каранфилић	АМ	Пециво	Филм са ЕО цимета показао је АМ активност и може се применити код пекарских производа.	<i>Souza и сар., 2013</i>
Целулоза ацетат	Рузмарин	АМ	Пилећа прса	Филм са 50 % ЕО је смањио раст укупних колиформних бактерија 6. дана.	<i>Melo и сар., 2012</i>
Целулозна смола	Оригано	АМ	Пица	У <i>in vitro</i> тесту дошло је до инхибиције <i>Penicillium spp.</i> и <i>Staphylococcus aureus</i> . Међутим, у <i>in vivo</i> условима, испитивана концентрација није била довољна да се постигне исти ефекат.	<i>Botre и сар., 2010</i>
Хитозан	Бергамот	АФ АВ	НА	ЕО уграђено у филм побољшало је својства баријере водене паре, смањило садржај влаге и растворљивост у води. Инхибиторни ефекат на раст микроорганизама и антиоксидативни капацитет зависили су од концентрације ЕО.	<i>Sanchez-Gonzalez и сар., 2010;</i> <i>Hafsa и сар., 2016</i>
Хитозан	Лимун Мајчина душица Цимет	АВ	НА	Филм са ЕО мајчине душице показао је највећу активност.	<i>Peng и Li, 2014</i>
Желатин	Ђумбир Куркума Тајландски ђумбир	АО	НА	Са повећањем концентрације додатих ЕО, повећана је и АО активност филмова. Највећи антиоксидативни капацитет показао је филм са додатком ЕО тајландског ђумбира.	<i>Tongnuanchan и сар., 2013</i>
Желатин/ хитозан	Каранфилић	АО	НА	Каранфилић ЕО је уграђен у филм на бази желатина и желатин-хитозана. Оба филма показала су АМ активност	<i>Gomez-Estaca и сар., 2010</i>
<i>k</i> -карагенан	<i>Satureja hortensis</i>	АМ АО	НА	Велики инхибиторни ефекат према бактеријама при додатку 3 % (v/v) ЕО у директном контакту, као и у парној фази, је запажен.	<i>Shojaee-Aliabadi и сар., 2013</i>
Метилцелулоза (МС) и мешавина поликапролактон/алгинат (PCL/ALG)	Оригано Пимент бобица Лимунска трава	АМ	Броколи	После 4 дана складиштења, PCL/ALG филмови били су ефикаснији према <i>Listeria monocytogenes</i> . Оба филма су показала исти ефекат према <i>Escherichia coli</i> .	<i>Takala и сар., 2013</i>



	Мушкатни орашчић Цитрал			Филмови на бази МС су током 12 дана складиштења показали јаку АМ ефикасност према <i>Salmonella Typhimurium</i> .	
<i>Семе дуње</i>	Оригано	АМ АО	НА	АМ и АО својства су значајно повећана са додатком ЕО. Инхибиција <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i> и <i>Yersinia enterocolitica</i> .	<i>Jouki u cap., 2014</i>
<i>Соја протеин</i>	Оригано мајчина душица	АМ	Млевена јунетина	Филмови су показали АМ активност у <i>in vitro</i> условима, али не и у <i>in vivo</i> . Додатак ЕО у филмове довео је до смањења броја <i>Pseudomonas</i> spp. и колиформних бактерија код млевених пљескавица током складиштења у фрижидеру. Међутим, није запажен ефекат на <i>Staphylococcus</i> spp., укупан број бактерија, и бактерије млечне киселине.	<i>Emiroğlu u cap., 2010</i>
<i>Концентрат протеина сунцокрета</i>	Каранфилић	АМ АО	Пљескавице од сардине	Додатак ЕО у филм смањио је липидну оксидацију и одложио раст укупних мезофила.	<i>Salgado u cap., 2013</i>
<i>Хитозан</i>	Лимонен лимунова трава оригано пеперминт црвена мајчина душица	АМ	Јагоде	Црвени тиммијан ЕО је показало најефикаснију АМ активност, чувајући квалитет јагода током 12 дана складиштења, праћен пеперминтом. Компоненте које чине лимунску траву и оригано ЕО су испарљивије, па могу изгубити АМ активност. Хитозан-лимонен премаз на јагодама, показао је највећу ефикасност током 12 дана складиштења, са прихватљивим укусом.	<i>Vu u cap., 2011</i>
<i>Зеин</i>	Цимет уље слачице	АМ	Парадајз	Број микроорганизама инокулисаних на површини парадајза смањио се са повећаном концентрацијом додатог ЕО током складиштења. Премаз на бази зеин са 20 % ЕО цимета показао је највећи АМ ефекат.	<i>Choi u cap., 2016</i>

\*АМ-антимикробна, АО-антиоксидативна, АФ-антифугална, АВ-антибактеријска, НА-није анализиран, ЕО-етарско уље.

### 2.5.1. Етарска уља *Satureja montana* L. и *Ocimum basilicum* L.

Фамилија *Lamiaceae* или *Labiatae* (уснатице) обухвата 200 родова и 3000 врста и представља космополите и фамилију биљака богату етарским уљима и фенолним једињењима. Најпознатије гајено и дивље растуће лековито биље чине управо представници фамилије *Lamiaceae*, међу којима су и *Satureja montana* (ртањски чај) и *Ocimum basilicum* (босиљак). Биљке из ове породице имају изражену биолошку активност: антибактеријску, антифугалну, антивиралну, инсектицидну, антиоксидативну, антиинфламаторну (*Bakkali u cap., 2008*). Испитивања антиоксидативне активности етарских уља и екстракта из биљних врста фамилије *Lamiaceae* показала су да имају еквивалентно или јаче антиоксидативно дејство од синтетичких антиоксиданата (*Filip, 2014*).

Ароматична биљка *Satureja montana* L., у нашој земљи позната и као **ртањски чај**, припада породици *Lamiaceae*, и широко је распрострањена на просторима Балкана, укључујући и Републику Србију где се може наћи на Ртањ планини по чему је и добила назив. Традиционално се употребљава као зачин и природни конзерванс хране. Уобичајени је састојак народних лекова у терапији разних дигестивних, респираторних и уринарних тегоба (*Vladić, 2017*).

*S. montana* спада у средње богате врсте у погледу садржаја етарског уља, који варира у зависности од различитих фактора и креће се од 0,9 до 2,2 % (*Skočibušić u Bezić, 2004; Bezić u cap., 2005*). Етарско уље *S. montana* припада фенолном хемотипу, где су у већини случајева најзаступљенији карвакрол и тимол, са значајним варијацијама. Због јаког фенолног карактера његовог етарског уља, укус и мирис ртањског чаја подсећа на оригано и мајчину душицу (*Ћавар u cap., 2008*). Осим карвакрола и тимола, у уљу су присутни и њихови биохемијски прекурсори, монотерпенски угљоводоници  $\gamma$ -терпинен и  $p$ -цимен. У значајном проценту могу бити присутни и борнеол, линалол, као и сесквитерпенска једињења  $\beta$ -кариофилен и кариофилен-оксид. Етарско уље садржи и мањи проценат  $\alpha$ -тујена,  $\alpha$ -терпинена,  $\gamma$ - и  $\alpha$ -пинена и мирцена (*Skočibušić u Bezić, 2004*). Највећи садржај тимола детектован је код младих биљака, а највећи садржај карвакрола код биљака у фази цветања. Садржај  $p$ -цимена се повећава са сазревањем биљке, док се садржај  $\alpha$ -терпинена и  $\gamma$ -терпинена смањује. Садржај монотерпенских алкохола, алдехида и естара такође се смањује сазревањем биљке (*Baser u cap., 2004*).

Ртањски чај је, због присутних фенола и терпена у свом етарском уљу, препознат као биљка са потенцијалним антиоксидативним и антимицробним деловањем. Значај и квалитет етарског уља не огледа се само у садржају његових најдоминантнијих конституената - карвакрола и тимола, познато је да многобројне компоненте присутне у

мањим концентрацијама могу доприносити укупном биолошком ефекту кроз синергистички ефекат (Vladić, 2017).

Претпоставља се да је присуство слободне хидроксилне групе и система делокализованих електрона круцијално за антибактеријско деловање. Основа за ову тврдњу је да *p*-цимен, који је прекурсор карвакрола, и разликује се од њега само по одсуству хидроксилне групе, и иако поседује већи партициони коефицијент за липидне мембране, испољава токсичност у знатно нижем степену од карвакрола (Ultee *u cap.*, 2002; Bezić *u cap.*, 2005). Резултати ових истраживања сугеришу могући потенцијал употребе етарског уља ове биљне врсте као природног конзерванса хране и могућег извора антибактеријских адитива у прехранбеној индустрији.

**Босиљак (*Ocimum basilicum* L.)** такође припада породици *Lamiaceae*, и представља једну од најраспрострањенијих и најчешће гајених биљака широм света. Босиљак се узгаја традиционално и у Србији, као зачинска, лековита, украсна и обредна биљка (Filip, 2014).

Према свом хемијском саставу босиљак припада ароматичним биљкама чији се квалитет цени према садржају етарског уља којег у херби има 0,5 - 0,8 %. Етарско уље босиљка је жуте до нараџасте боје, са пријатним мирисом који припада средњој мирисној ноти за које је карактеристично да је умерено испарљива. Етарско уље босиљка има антисептично, антиинфламаторно, антимиembroбно и антоксидативно деловање (Filip, 2014).

Етарско уље садржи око 30 карактеристичних компонената, терпене (монотерпени и сесквитерпени, као и њихови оксидовани деривати) и фенолна једињења. Доминантне компоненте етарског уља су првенствено фенолна једињења: метил хавикол (естрагол), линалол, еугенол, метилеугенол и метилцинамат. Постоји значајна разлика у садржају и хемијском саставу етарског уља зависно од врсте и поднебља на коме се узгаја босиљак. Такође, постоји велика варијација и у садржају појединих компонената у етарском уљу (Filip, 2014).

Према географском пореклу сорти босиљка и на основу њихових главних састојака, оне се класификују у четири хемотипа (Murarikova *u cap.*, 2017):

- европски хемотип, чије уље карактерише велика количина линалола (35-50%) и естрагола ( 15-25%);
- хемотип реунион (естрагол босиљак) чија је главна компонента етарског уља естрагол (80 % или више);
- тропски хемотип (цимет босиљак), уље у којем доминира метил циннамат и
- еугенол хемотипе чија је главна компонента еугенол.

На садржај (принос екстракције) и квалитативан, као и квантитативни профил етарског уља босиљка имају значајан утицај и сорта, сезона култивације, као и начин добијања уља (*Murarikova и сар., 2017*).

Европски хемотип босиљка поседује најквалитетнију арому и као главне компоненте садржи линалол и метилхавикол, а у мањој мери 1,8-цинеол,  $\alpha$ -пинен,  $\beta$ -пинен, мирцен, терпинолен, камфор, терпинен-4-ол,  $\alpha$ -терпинеол, еугенол и сесквитерпене (*Filip, 2014*).

На основу литературних података, компоненте етарског уља босиљка код којих је најчешће проучавана антиоксидативна активност су: линалол, метил-хавикол, 1,8-цинеол и еугенол. Фенолне компоненте показују највеће антиоксидативно деловање. Сматра се да је антиоксидативна активност последица способности фенола да буду донори водоникових атома и да при томе прекидају слободно-радикалске реакције, при чему прелазе у феноксил радикал који се стабилизује путем резонантних структура. Остале присутне компоненте имају синергистички ефекат и повећавају антиоксидативно деловање етарског уља (*Filip, 2014*).

---

## 2.6. Примена инкапсулације и $\beta$ -циклодекстрина код добијања активних биополимерних амбалажних материјала

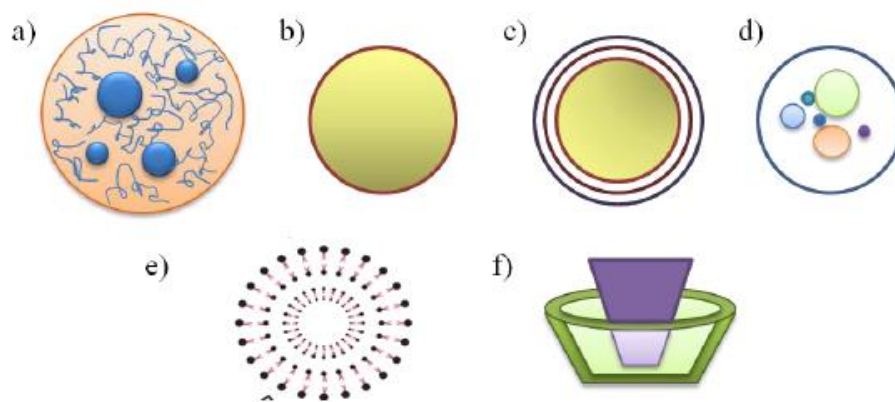
---

Феномен инкапсулације је први запазио и описао холандски хемичар *Bungenberg de Jong* 1932. године, када је током експеримента са колоидним системима уочио појаву микрокапсулираних коацервата налик ћелијама (*Bungenberg de Jong*, 1932). Први патентирани поступак инкапсулације датира из 1957. године и коришћен је за производњу папира за копирање импрегнираног микрочестицама са инкапсулираном бојом (*Green u Schleicher*, 1957).

Под појмом микрокапсулација подразумева се процес формирања омотача (енг. *shell, coating, membrane, wall, carrier, matrix*, итд.) око материје језгра (енг. *core material, active agent/material, inner phase, nucleus, payload*, итд.) које се налазе у облику малих, чврстих честица, капљица, или гасних мехурова. Пречник микрокапсула се креће од 1 до 1000  $\mu\text{m}$ . Честице чији је пречник мањи од 1  $\mu\text{m}$  се називају нанокапсуле, док је код макрокапсула пречник вечи од 1000  $\mu\text{m}$  (*Katona*, 2017).

Језгро микрокапсуле може бити у кристалном стању, емулзија, чврста суспензија или суспензија малих микрокапсула. Микрокапсуле могу имати вишеслојне зидове. Различит тип микрокапсула и микросфера зависи од грађе зида, да ли је мономер или полимер, као и од процеса микрокапсулације. Основна подела микрочестица је на резервоар тип (микрокапсуле), са једним или више слојева омотача, или типа матрикса (микросфере) где је материја језгра равномерно распоређена/диспергована у матриксу (*Katona*, 2017). Добијене микрокапсуле могу имати различиту морфологију, али се могу сврстати у неколико основних типова (**Слика 2.7.**) (*Ђорђевић и сар.* 2015):

- (a) честице типа матрице;
- (b) честице типа резервоара које имају језгро обавијено омотачем;
- (c) мулти-мембранске честице (обавијене са више опни);
- (d) честице типа мулти-језгро;
- (e) честице са фосфолипидним довослојем;
- (f) капсуле настале процесом молекуларне инклузије.



**Слика 2. 7.** Основни типови микрокапсула: (a) матрице, (b) резервоар, (c) мулти-мембранске честице, (d) мулти-језгро, (e) са фосфолипидним довослојем, (f) капсуле настале процесом молекуларне инклузије (Ђорђевић и сар., 2015)

Специфичан облик капсула у различитим системима је условљен процесом инкапсулације, као и типом супстанце која се инкапсулира и материјала који се користи као носач (Trifković, 2016).

### 2.6.1. Значај и циљ инкапсулације

Главни циљ инкапсулације јесте заштита активних компоненти од штетних дејстава околине. Формирање микрокапсула, материје језгра са физичком баријером (омотачем), одваја од средине у којој се налази, чиме се постиже низ ефеката. Неки од основних разлога за инкапсулацију у прехранбеној индустрији су следећи (Desai и Park, 2005; Fang и Bhandari, 2010; Gaonkar и сар., 2014; Katona, 2017):

- заштита биоактивних супстанци од деградације и различитих утицаја околине као што је влага, кисеоник, UV зрачење, температура;
- маскирање нежељених арома или укуса биоактивних супстанци;
- смањење испарљивости материја као што су ароматичне материје, мириси, биљни екстракти;
- модификација карактеристика биоактивних супстанци у циљу омогућавања лакше манипулације, као што је нпр., превођење течности у прашкасто стање, или превођење нерастворљивих хидрофобних једињења у једињења растворљива у води;

- редуковање негативне и нежељене интеракције активне компоненте са другим компонентама, или састојцима хране у сложеним прехранбеним и фармацеутским производима;
- смањење концентрације активне компоненте, у случајевима када су потребне мале количине, при чему се одржава униформна дисперзија у носачу;
- пројектовање отпуштања активне компоненте поступно, тј. продужено/контролисано у току времена, или у одређеном тренутку и на одређеном месту.

Најчешће се микрокапсулирају материје ради маскирања непријатног мириса и укуса, лако испарљиве и ароматичне материје у прехранбеној индустрији, лековите материје ради добијања препарата продуженог дејства у фармацеутској индустрији, затим се примењују код производње пестицида, детрџената, копир папира, итд.. Последњих година користи се и у биоинжењерству за имобилизацију живих ћелија и различитих ензима помоћу полупропустљивих мембрана синтетског или природног порекла. Разни нутритивенти могу бити инкапсулирани, укључујући витамине, антиоксидансе, полинезасићене масне киселине, каротеноиде, фитостероле и биоактивне пептиде.

### **Избор омотача/филмогене материје**

У пракси се користи читав низ различитих материја природног или синтетског порекла, као омотачи микрокапсула, а све у зависности од намене микрокапсула и/или једињења које се инкапсулира. Често се користи смеша две или више филмогених материја или њихова комбинација са неким нискомолекуларним једињењима, како би се добио омотач оптимизованих, бољих својстава. Материјал за инкапсулацију треба да испуњава следеће критеријуме:

- да буде биокомпатибилан;
- да буде нетоксичан према инкапсулираним компонентама;
- да омогући да активни састојци остану у оквиру капсуле током процеса производње и складиштења при различитим условима;
- да не реагује са инкапсулираним материјалом;
- да има добре реолошке карактеристике;
- да не пропушта друге молекуле кроз зид;
- да има довољну пропустљивост мембране.

Да би дошло до формирања микрочестица, неопходно је да постоји некомпатибилност између омотача и активног састојка, како би, услед ове

некомпатибилности, на површини језгра настала превлака, односно омотач. У том случају, уколико су у питању хидрофобни активни састојци, за инкапсулирање се мора користити хидрофилни материјал, и обрнуто. За инкапсулацију се користи широк спектар полисахарида, протеина и полимера у ову сврху, датих на **Слици 2.8** (Gaonkar *u cap.*, 2014).



**Слика 2. 8.** Подела омотача који се користе у поступку инкапсулације (Gaonkar *u cap.*, 2014)

### 2.6.2. Технике инкапсулације

Технике које се користе у поступку инкапсулације могу се поделити на физичке и хемијске. У случају физичких инкапсулационих техника обично се формирају микросфере, док су хемијски порцеси обично повезани са стварањем микрокапсула. Микрокапсуле, имају јасно дефинисану морфологију омотача и љуске, док се микросфере механички формирају и немају јасно дефинисан омотач и језгро, већ се активни састојци распршују унутар матрице (Gaonkar *u cap.*, 2014). Различите технике које се користе у поступку инкапсулације представљене су у **Табели 2.2.**



**Табела 2. 2. Технике инкапсулације (Ђорђевић и сар., 2015; Трифковић, 2016; Катона, 2017)**

ТЕХНИКЕ ИНКАПСУЛАЦИЈЕ		ОСОБИНЕ ТЕХНИКЕ		ОСОБИНЕ МИКРОКАПСУЛА
		Позитивне	Негативне	
<i>Сушење распршивањем у струји врелог ваздуха Спреј-сушење</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• једноставна</li> <li>• ниски трошкови</li> <li>• велика продуктивност</li> <li>• широк избор носача</li> <li>• ефикасност инкапсулације 10 – 90 %</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• контрола величина честица</li> <li>• неадекватна за термоосетљиве активне супстанце</li> <li>• умерени приноси у малим шаржама</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• матрикс тип</li> <li>• сферичне честице</li> <li>• чешће хидрофобна материја језгра</li> <li>• прахови</li> <li>• неунформне величине</li> <li>• тенденција агрегације</li> </ul>
<i>Сушење распршивањем у струји хладног ваздуха Спреј-хлађење</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• мањи оперативни трошкови у поређењу са спреј-сушењем</li> <li>• адекватна за термоосетљива једињења</li> <li>• ефикасност инкапсулације 10 – 100 %</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• контрола величине честица</li> <li>• умерени приноси у малим шаржама</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• матрикс тип</li> <li>• хидрофилна материја језгра, хидрофобан омотач</li> <li>• брзо отпуштање активне супстанце</li> </ul>
<i>Облагање у флуидизованом слоју</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• економичан процес</li> <li>• контрола расподеле величине честица</li> <li>• формирање додатне мембране око добијених инкапсулата</li> <li>• ефикасност инкапсулације 5 – 50 %</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• деградација термоосетљивих једињења</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• резервоар тип</li> <li>• мулти-мембрана</li> <li>• мулти-језгро</li> <li>• споро отпуштање активне супстанце</li> </ul>
<i>Инкапсулација у микрогелове</i>	<i>екструзија</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• исплатива</li> <li>• неинвазивна</li> <li>• може да се изводи у аеробним и анаеробним условима</li> <li>• већи капацитет производње</li> <li>• ефикасност инкапсулације 20 – 50 %</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Scale up</i> процес тешко извести</li> <li>• веома вискозни полимери</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• матрикс, резервоар тип</li> <li>• мулти-мембрана</li> <li>• мулти-језгро</li> <li>• сферичне</li> <li>• добра стабилност према оксидацији</li> <li>• брзо иницијално отпуштање активне компоненте из инкапсулата типа материце</li> </ul>
	<i>емулговање</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• једноставнији <i>Scale up</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• скупљи процес</li> <li>• тешка контрола процеса</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• матрикс, резервоар тип</li> <li>• мулти-мембрана</li> <li>• мулти-језгро</li> <li>• сферичне</li> </ul>

				<ul style="list-style-type: none"> <li>• брзо иницијално отпуштање активне компоненте из инкапсулата типа матрикс</li> </ul>
<i>Комплексна коацервације</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• може се користити за термоостељиве супстанце</li> <li>• ефикасност инкапсулације 40 – 90 %</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• висока цена</li> <li>• комплексан механизам</li> <li>• осетљива метода на услове окружења</li> <li>• употреба органских растварача</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• резервоар тип</li> <li>• мулти-мембрана</li> <li>• сферичне честице са неколико језгара</li> <li>• могућност формирања вишеслојног омотача</li> <li>• контролисано отпуштање</li> <li>• добра стабилност током складиштења</li> </ul>	
<i>Емулзионе технике</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ниска цена</li> <li>• за термостабилне супстанце</li> <li>• могућност <i>Scale up</i> процеса</li> <li>• мале капљице</li> <li>• широк опсег величина и облика честица</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• високи оперативни трошкови/ниска енергетска ефикасност</li> <li>• могућност полимеризације</li> <li>• ограничен број емулгатора безбедних за храну</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• резервоар тип</li> <li>• мулти-језгро</li> <li>• мулти-мембрана</li> <li>• сферичне</li> <li>• полидисперзне</li> <li>• контролисано отпуштање активних компоненти из вишеслојних емулзија</li> </ul>	
<i>Инкапсулација у липозоме</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ефикасност инкапсулације 5 – 50 %</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• висока цена <i>Scale up</i> процеса</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• хидрофилан омотач, језгро</li> <li>• фосфолипидни двослој</li> <li>• стабилне у срединама са великом <math>a_w</math></li> <li>• контролисано отпуштање</li> </ul>	
<i>Инкапсулација у циклодекстрине</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ефикасност инкапсулације 30 – 100 %</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• висока цена циклодекстрина</li> <li>• ограничена на једињења мале молекулске масе</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• молекуларна инклузија</li> <li>• повећана растворљивост хидрофобних молекула</li> <li>• инкапсулација појединачних молекула</li> <li>• контролисано отпуштање</li> <li>• тенденција агрегације</li> </ul>	
<i>Инкапсулација на бази супер-критичних флуида</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• без употребе органских растварача, посуда, високих температура и механичког стреса</li> <li>• ефикасност инкапсулације 20 – 100 %</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• тешка контрола процеса</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• матрица</li> <li>• резервоар</li> <li>• тенденција агрегације</li> </ul>	
<i>Инкапсулација у ћелије квасца</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• једноставан процес</li> <li>• економичан процес</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• резервоар</li> <li>• термостабилни до 250 °C</li> <li>• постепено отпуштање</li> </ul>	

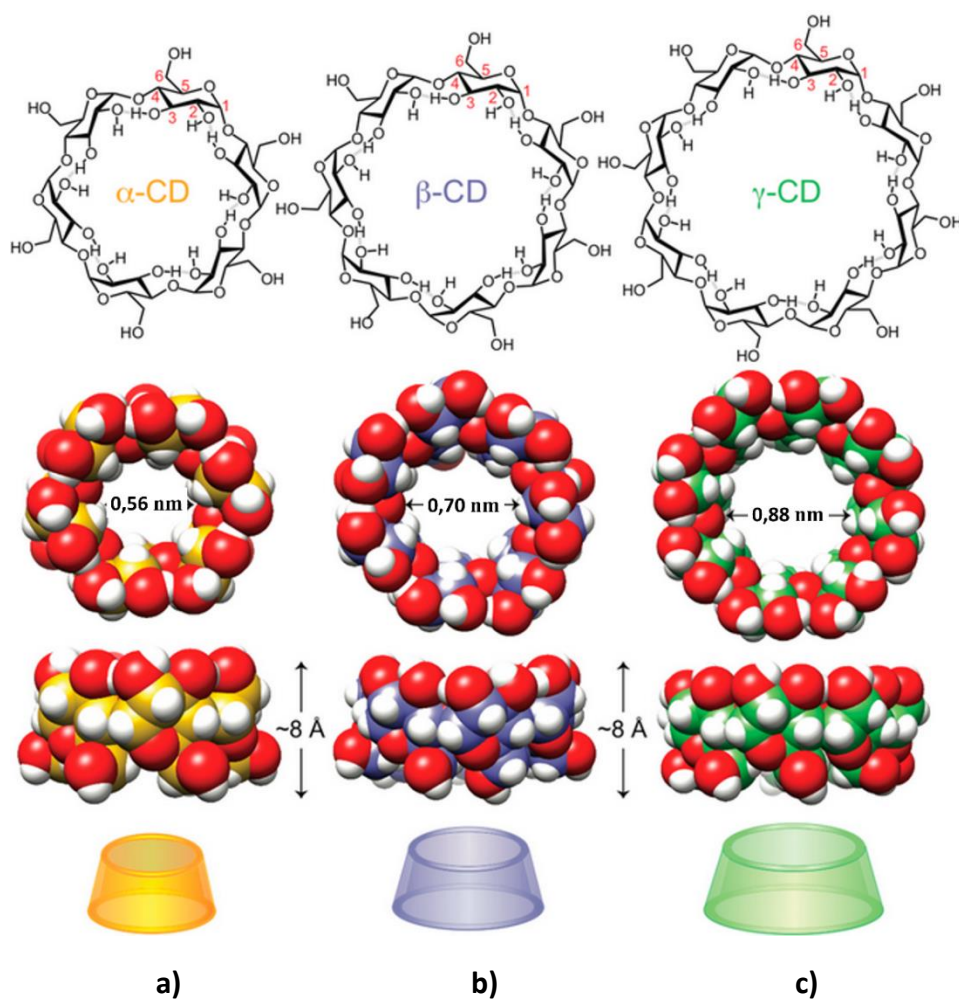
### 2.6.3. Молекуларна инклузија применом $\beta$ -циклодекстрина

Молекуларна инклузија је техника инкапсулације у току које долази до формирања инклузионог комплекса. Код ове технике, као омотачи, користе се материјали који садрже шупљине у структури, и представљају молекуле „домаћина“, у које се заробљавају молекули „гостију“. До интеракција између ових молекула долази услед формирања физичко-хемијских сила, као што су водонична веза, ван дер Валсове силе или хидрофобне интеракције (Marques, 2010; Ozkan *u cap.*, 2019). Ови комплекси настају реакцијом која се одвија само у присуству воде (Desai *u Park*, 2005). У прехранбеној индустрији, као молекули „домаћина“ значајну примену нашли су циклодекстрини (CD) (Ozkan *u cap.*, 2019).

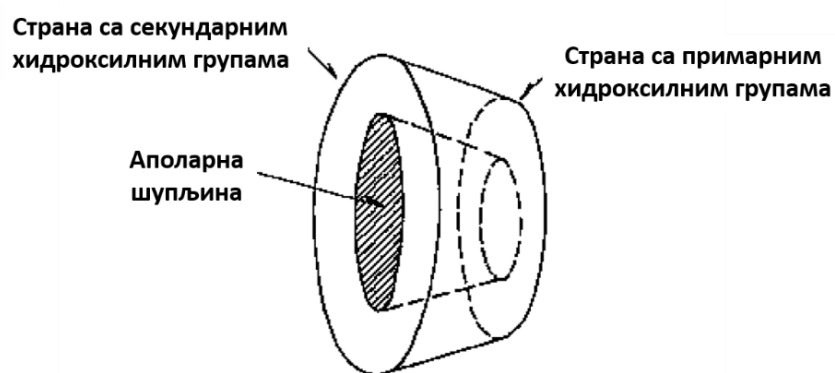
Циклодекстрин је откривен око 1981. године, када је Villier открио нови дериват скроба добијен разградњом бактерија, сличних својстава као деривати целулозе (Szejtli, 1998). Дванаест година касније, приликом проучавања бактеријске дигестије скроба, Szejtli (Szejtli, 1998) је идентификовао два кристална производа са истим карактеристикама. Продубљујући студије, усавршио је поступак добијања ових кристала и изоловао бактерију која их производи, *Bacillus macerans* (Capelezzo *u cap.*, 2018).

Циклодекстрини су циклични олигосахариди произведени од скроба. Најчешће коришћени циклодекстрини су  $\alpha$ -циклодекстрин ( $\alpha$ -CD),  $\beta$ -циклодекстрин ( $\beta$ -CD) и  $\gamma$ -циклодекстрин ( $\gamma$ -CD), који се међусобно разликују по броју глукосидних јединица повезаних  $\alpha$ -1,4-глукосидних везама, и могу да садрже шест ( $\alpha$ -CD), седам ( $\beta$ -CD) или осам ( $\gamma$ -CD) глукосидних јединица. Међусобно се разликују на основу величине прстена и растворљивости (Слика 2.9.). Како расте број глукосидних јединица, расте и дијаметар прстена и шупљине унутар њега. Шупљина прстена циклодекстрина је пречника од 0,5 до 0,9 nm и овај простор може да прими молекуле друге врсте, што представља молекуларно инкапсулирање.

Циклодекстрини имају тороидне или скраћене молекуле у облику конуса са унутрашњом шупљином (Szente *u Szejtli*, 1999; Mura, 2014). Управо оваква прстенаста структура или „крофна“ структура, чини их посебним. Хидроксилне функције су оријентисане на спољашњости конуса са примарним хидроксилним групама на уској ивици конуса и секундарним хидроксилним групама на широј ивици. Они садрже хидроксилне групе ОН-2, ОН-3 и ОН-6. Секундарне хидроксилне групе (ОН-2 и ОН-3) су на широј, а примарне (ОН-6) на ужој страни цилиндричног молекула (Слика 2.10.).



Слика 2. 9. Структура и пречник шупљине (a)  $\alpha$ -циклодекстрина ( $\alpha$ -CD), (b)  $\beta$ -циклодекстрина ( $\beta$ -CD) и (c)  $\gamma$ -циклодекстрина ( $\gamma$ -CD) (Bruns, 2019)



Слика 2. 10. Шематски приказ структуре  $\beta$ -циклодекстрина (Patel, 2017)

Јака водонична веза постоји између ОН-2 и ОН-3 групе, при чему се ОН-3 група понаша као донор протона. Однос јачина водоничних веза код циклодекстрина је следећи:  $\alpha\text{-CD} < \beta\text{-CD} < \gamma\text{-CD}$ . Групе ОН-6 такође могу да се повезују водоничним везама са доње стране молекула, али су ове везе дестабилизоване диполарним ефектима, лако се распадају у води и обично их нема у кристалима циклодекстрина. Централне шупљине обложене су скелетним угљеницима и етеричним кисеоницима остатака глукозе, што им даје липофилни карактер. Процењено је да је поларитет шупљине сличан оном у воденом етанолном раствору. Док су на спољним странама шупљине -ОН групе, у унутрашњости молекула су атоми водоника. У воденом раствору ове хидрофобне шупљине садрже 3 ( $\alpha\text{-CD}$ ), 7 ( $\beta\text{-CD}$ ) или 9 ( $\gamma\text{-CD}$ ) слабо везаних молекула воде. Њихова густина у шупљинама је мала, а оне су довољно велике да приме још молекула. Циклодекстрини могу да вежу неполарне алифатичне и ароматичне молекуле одговарајућих димензија. Као резултат овакве структуре, са једне стране, CD имају способност да заробе хидрофобне молекуле (*Friné u cap., 2019*) етарских уља или њихове биоактивне молекуле. На тај начин могу стабилизovati испарљива или нестабилна једињења, као и смањити арому, укус и мирис, омогућавајући етарским уљима да задрже своју активност током дужег временског периода (*Hill u cap., 2013*). С друге стране, због своје спољашње хидрофилне природе, CD могу да смање хидрофобност површине једињења и да побољшају растворљивост хидрофобних једињења у води и постепено повећају њихову ефикасност применом нижих концентрација ових једињења (*Friné u cap., 2019*). Такође, брзина отпуштања гостујућих молекула може се контролисати или успорити (*Chen u cap., 2019*).

Регулаторни статус циклодекстрина је у развоју.  $\alpha$ -циклодекстрин и  $\beta$ -циклодекстрин се већ налазе на листи бројних извора фармакопеје, укључујући америчку, европску и јапанску фармакопеју.  $\beta$ -циклодекстрин и  $\gamma$ -циклодекстрин се такође налазе на листи општепризнатих сигурних супстанци (GRAS), Управе за храну и лекове (FDA), за употребу као адитиви у прехранбеној индустрији.

### **Механизам формирања $\beta$ -циклодекстрин инклузионог комплекса**

У воденој средини циклодекстрини могу да формирају инклузиони комплекс са разноврсним чврстим, течним и гасовитим супстанцама. Током овог поступка гостујући молекули, или чешће неки липофилни делови молекула, се увлаче и „заробљавају“ унутар хидрофобног дела, односно унутрашње шупљине циклодекстрина (**Слика 2.11.**) (*Ozkan u cap., 2019*).

Инклузиони комплекс се одржава помоћу хидрофобних сила и ван дер Валсових интеракција, као и водоничним везама што инклузиони комплекс чини енергетски стабилнијим (*Del Valle, 2004; Manakker, 2009; Pinho u cap., 2014*). Покретачке силе за

стварање комплекса обухватају ослобађање молекула воде из шупљине циклодекстрина, електростатичке интеракције, ван дер Валсове интеракције, хидрофобне интеракције, водоничне везе између гостујућих молекула и циклодекстрина. Физичко-хемијска својства слободних гостујућих молекула разликују се од оних везаних за молекуле циклодекстрина. Такође, физичко-хемијска својства слободних молекула циклодекстрина разликују се од оних у формираном комплексу.



**Слика 2. 11.** Поступак формирања  $\beta$ -циклодекстрин инклузионог комплекса (Sharma и Baldi, 2016)

Везивање активних једињења унутар шупљине циклодекстрина није трајно, већ представља динамичку равнотежу. На овај начин, стварање инклузионог комплекса резултат је равнотеже између слободних молекула активних једињења и циклодекстрина, и насталих инклузионих комплекса активних једињења и циклодекстрина (Cevallos *u cap.*, 2010; Capelezzo *u cap.*, 2018). Према томе, неки фактори могу утицати на формирање инклузионог комплекса, као што су врста циклодекстрина, величина шупљине, рН, температура и начин припреме (Marques, 2010). Ипак, стабилност комплекса повезана је са количином воде коју циклодекстрин може ослободити из унутрашњости током инкапсулације гостујућег молекула (Inoue *u cap.*, 1993; García-Río *u cap.*, 2007; García-Río *u cap.*, 2010).

Међу циклодекстринима,  $\beta$ -облик је најприступачнији и најшире коришћен циклодекстрин (Andrade-Del Olmo *u cap.*, 2019), јер његова аполарна шупљина може да прими молекуле молекуларне масе између 100 и 400 g mol<sup>-1</sup>, што је опсег молекуларне масе већине молекула од значаја.  $\beta$ -CD је такође лако индустријски обновити поступком кристализације (Wang, 2011), а има најмању растворљивост и средњу величину од осталих облика CD. Поред тога, производња  $\beta$ -CD је економски најисплативија, са индустријским

трошковима по килограму приближно 20 пута нижим од трошкова осталих типова CD (Szente u Szejtli, 1999).

Због растворљивости CD у води и способности да формирају реверзибилне инклузионе комплексе са неполарним молекулима у воденом раствору, молекули воде богати енталпијом унутар прстена CD лако се замењују, супституишу, неполарним молекулима или молекулима мање поларности од воде, формирајући структуре који су енергетски стабилније.

Постоји неколико метода за формирање инклузионог комплекса између циклодекстрина и активних молекула, а одабир процеса се заснива на својствима гостујућег молекула, доступним уређајима и трошковима (Marques, 2010). Најчешће први корак подразумева растварање  $\beta$ -циклодекстрина у води или смеси етанол-вода, до потпуног растварања или до формирања концентроване суспензије, након чега се додају активна једињења директно или у виду емулзије и мешају са суспензијом до формирања инклузионог комплекса. Методе најчешће захтевају додатне пост-процесе, као што су методе сепарације, нпр филтрација, и сушења формираног инклузионог комплекса. Неке од коришћених поступака сушења формираног инклузионог комплекса на бази  $\beta$ -циклодекстрина и инкапсулираног једињења су сушење у сушници и лиофилизација.

### **Примена инклузионог комплекса $\beta$ -циклодекстрина у прехранбеној индустрији и за добијање активне амбалаже**

Циклодекстрини су нашли широку употребу у многим индустријама, између осталог и у прехранбеној индустрији где се доста користе у преради хране и као адитиви са различитим циљевима (Astray u cap., 2010):

- да заштите липофилне компоненте хране осетљиве на кисеоник, светлост или топлоту;
- да побољшају хемијску и физичку стабилност и растворљивост једињења у води;
- да омогући растварање боја за храну и витамина;
- за стабилизацију мириса, укуса, витамина и етарских уља од нежељених промена;
- за сузбијање непријатних мириса или укуса;
- да се постигне контролисано отпуштање активних инкорпорираних једињења у намирнице и на тај начин омогући продужетак рока трајања.

У прехранбеној индустрији циклодекстрини су нашли комерцијалну примену за добијање производа који не смеју да садрже холестерол. Код ових производа,

циклодекстрин има улогу да зароби у своје шупљине молекуле холестерола, и на тај начин га уклања.

Студије су се бавиле могућношћу формирања инклузионог комплекса са различитом класом једињења, као што су алифатични алкохоли (*García-Río u cap., 2005; Cabaleiro-Lago u cap., 2006*), амини и киселине (*Gadosy u cap., 2000*), аминокиселине (*Tee u cap., 1997*), кетони (*Iglesias, (2003)*), сурфактантни (*Dorrego u cap., 2000; Fernández u cap., 2000; García-Río u cap., 2004*) и друге компоненте (*Rekharsky u Inoue, 1998; García-Río u cap., 2006*).

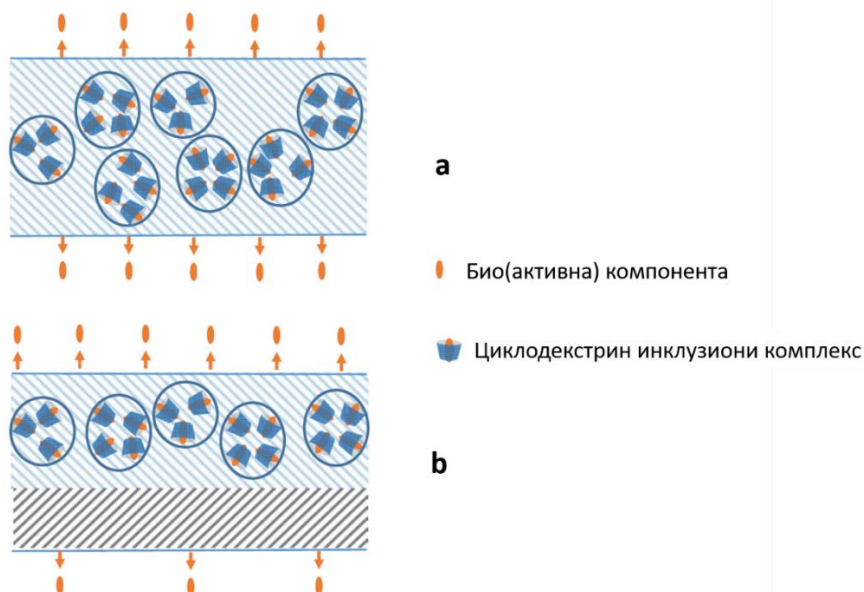
Најчешћа техника инкапсулације етарских уља је формирање инклузионог комплекса са  $\beta$ -циклодекстрином. Формирањем инклузионог комплекса са етарским уљима, може се постићи маскирање укуса и мириса етарских уља, као и заштитити од оксидације и других спољашњих фактора. На овај начин могуће је обезбедити ефикасност и активност етарских уља за дужи временски период. Формирање инклузионог комплекса може да смањи сензорски утицај етарских уља на прехранбене производе и повећа њихову растворљивост у води, омогући дужи контакт са патогеним, инхибира њихов раст, чинећи храну безбеднијом за људску употребу. Поред тога, утврђено је да циклодекстрин делују као секундарни антиоксиданси у комбинацији са другим антиоксидантима. Овакав систем показује синергистичке појаве што резултира тиме да је антиоксидативни капацитет система очуван или чак побољшан (*Li u cap., 2015*).

Употреба  $\beta$ -циклодекстрин код активне амбалаже све више налази на значају. Приликом производње активних амбалажних материјала, током припреме филма, активност агенаса која се додају директно у филмогену емулзију, може се смањити услед утицаја различитих фактора који се примењују за припрему биополимерног амбалажног материјала, као што су повишене температуре, хомогенизација, рН раствора, притисак, изложеност светлости и кисеонику, итд.. Када су у питању етарска уља, обзиром на њихов састав и велики број испарљивих компоненти, ова једињења могу испарити већ током припреме филма, а велики садржај испарљивих компоненти се ослободи и пре него што доспе у контакт са намирницама (*Barba u cap., 2015; Navarro u cap., 2016*). Губитак активности једињења која се додају у активне материјале, доводе и до губитка активности самог материјала током времена. Такође, хидрофобне компоненте попут етарских уља или њихових главних једињења имају слабу растворљивост у води, док је већина биополимера који се користе за синтезу филмова (алгинат, скроб, карагенан, целулоза итд.) растворљива у води (*Bustos u cap., 2016*). Услед ове фазне некомпатибилности, уградњу хидрофобних једињења у филмове на бази биополимера често је врло тешко постићи. У оваквом систему капљице уља могу бити нестабилне и довести до фазе коалесценције, све док се липидна фаза потпуно не раздвоји и појави на површини филма.



Нови приступ у индустрији конзервирања хране и производњи активне амбалаже, укључује употребу различитих средстава за инкапсулацију како би се створиле микро и наночестице, које су намењене заштити активне компоненте и омогућавају њихово постепено и споро ослобађање у прехранбеном производу. Употребом хидрофилног материјала за формирање зида капсула, активна компонента се лако може инкорпорирати у хидрофилне биополимерне филмове (Bustos *u cap.*, 2016). Поред тога, може се смањити испарљивост компоненте, као и заштити инкапсулирану материју од различитих спољашњих фактора: температуре, влаге, UV зрака, интеракције са другим компонентама или компонентама хране, и неутралисање сензорског утицаја. Одабиром одговарајућих омотача и методе инкапсулације, могло би се омогућити постепено ослобађање активних компоненти, под одређеним, жељеним условима, и тако утицати на одрживост квалитета упакованог производа током дужег временског периода, па чак и продужити његов рок трајања (Wang *u cap.*, 2016; Riquelme *u cap.*, 2017). Произведене микрочестице се могу додати директно у прехранбени производ или се могу уградити у амбалажне материјале за паковање у циљу добијања активне амбалаже.

Амбалажни материјали са инклузионим комплексом на бази  $\beta$ -CD могу бити у форми филмова, ламината, контејнера. Да би се постигле или појачале одређене особине материјала за паковање, попут боје, мириса, антибактеријске и антимикробне активности, или баријерног својства пропуштања светлости, одговарајуће компоненте се могу уградити у носећи полимер или у засебан слој премаза на полимерном матриксу (Слика 2.12.).



**Слика 2. 12.** Различити начини уградње  $\beta$ -циклодекстрин инклузионог комплекса у активне материјале: а) уграђен у полимер б) као премаз на полимерни материјал (Szente *u Fenyvesi*, 2018)

У овим материјалима, сложене супстанце се хомогено распршују и полако ослобађају из полимерне матрице (*Koontz и Marcy., 2007*). Брзина отпуштања активног једињења зависи од његове концентрације у полимеру, афинитета према циклодекстрину, коефицијента дифузије у полимеру, коефицијента расподеле између полимера и циклодекстрина, као и између полимера и упакованог предмета, а такође зависи и од температуре и времена (*Poverenov и сар., 2013*).

У **Табели 2.3.** је дат преглед примене CD инклузионих комплекса и „гостујућих“ компоненти, као и примена празних CD честица код амбалажних материјала.

Циљ уградње празних циклодекстрина у амбалажни материјал је да се спречи губитак ароме/мириса из амбалаже или да се омогући сорпција нежељених испарљивих компонената које би у супротном продрле у упаковани производ. Осим тога, циљ је успорити брзину миграције (дифузије и преноса) унутрашњих и спољашњих испарљивих материја из самог амбалажног материјала, из околине (унутра) или из упакованог производа (споља).

**Табела 2. 3. Преглед примене циклодекстрина код амбалажних материјала (Szente и Fenyvesi, 2018)**

<b>(БИО)ПОЛИМЕРНИ МАТЕРИЈАЛ</b>	<b>АКТИВНА КОМПОНЕНТА</b>	<b>ФОРМА</b>	<b>ПРИМЕНА</b>	<b>РЕФЕРЕНЦА</b>
<i>полиетилен</i>	алил изоцијанат	филм	антимикробно	<i>Shin и Mokwena, 2012</i>
<i>полилактична киселина</i>	алил изоцијанат	филм, контејнер	антимикробно паковање сира	<i>Plackett и cap., 2006; Plackett и cap., 2007</i>
<i>микрофибрилирана целулоза</i>	карвакрол	папир	антибактеријско паковање	<i>Lavoine и cap., 2014</i>
<i>хитозан</i>	карвакрол	филм	антимикробно паковање за пилећи филе	<i>Higueras и cap., 2014</i>
<i>оксидована целулоза</i>	карвакрол	филм	продужено ослобађање	<i>De Castro и cap., 2018</i>
<i>поли(етилен гликол) диакрилат</i>	етилен	филм	контролисано зрење контролисаним ослобађањем етилена	<i>Bazzano и cap., 2016</i>
<i>хитозан</i>	етарско уље	филм	антибактеријско паковање	<i>Sun и cap., 2014</i>
<i>хитозан/поли(винил алкохол)</i>	етарско уље	филм	антифугална електроспун нановлакна	<i>Munhuweyi и cap., 2018</i>
<i>поли(винил алкохол)</i>	етарско уље	филм	антимикробна електроспун нановлакна	<i>Feng и cap., 2017</i>
<i>полилактична киселина</i>	етарско уље	филм	антимикробна електроспун нановлакна	<i>Wen и cap., 2016</i>
<i>зеин</i>	етарско уље	мембрана	антимикробна електроспун нановлакна	<i>Dias Antunes и cap., 2017</i>
<i>хитозан</i>	гална киселина	филм	антиоксидант за масну храну	<i>Rezaee и cap., 2018</i>
<i>поли(винил алкохол)</i>	гераниол	филм	продужена трајност	<i>Kayaci и cap., 2014</i>
<i>пулулан</i>	лимонен	електроспун нановлакна	активно паковање хране	<i>Fuenmayor и cap., 2013</i>
<i>поли(бутилен сукцинат)</i>	лимонен	композитни филмови	антимикробно паковање хране	<i>Mallardo и cap., 2016</i>
<i>полистирен</i>	метил-циклопропен	филм од влакана	ослобађање изазвано влагом	<i>Neoh и cap., 2017</i>
<i>целулоза сулфат</i>	уље слачице	филм	антимикробни јетиви филмови и премази	<i>Chen и cap., 2016</i>
<i>полилактична киселина, полиетилен</i>	2-нонан	филм	антибактеријско паковање	<i>Abarca и cap., 2017</i>
<i>поли(етилен оксид)</i>	уље чајевца	филм нановлакна	антибактеријско паковање	<i>Cui и cap., 2018</i>

<i>зеин</i>	тимол	нанофбриозна мрежа	антибактеријско паковање хране	<i>Aytac u cap., 2017a</i>
<i>полиетилен</i>	α-токоферол	филм	дуготрајно антиоксидативно дејство	<i>Koontz u cap., 2010; Siro u cap., 2006</i>
<i>полилактична киселина</i>	α-токоферол	нанофбриозна мрежа	амбалажа за паковање меса	<i>Aytac u cap., 2017b</i>
<i>полилактична киселина</i>	транс-2-хексанал	листови	антимикробно паковање хране	<i>Joо u cap., 2012</i>
<i>полилактична киселина</i>	триклосан	нанофбриозна мрежа	антибактеријско паковање	<i>Kayaci u cap., 2013</i>
<b><i>Примена празног циклодекстрина код амбалажних материјала</i></b>				
<b><i>(БИО)ПОЛИМЕРНИ МАТЕРИЈАЛ</i></b>	<b><i>ФОРМА</i></b>	<b><i>ПРИМЕНА</i></b>		<b><i>РЕФЕРЕНЦА</i></b>
<i>термопластични картон</i>	амбалажни материјал	баријера за пропуштање испарљивих материја		<i>Wood, 2000</i>
<i>целулоза ацетат</i>	мембрана	амбалажа за пржену млевену кафу која чува арому		<i>Asslisi, 2011</i>
<i>етилен-винил алкохол кополимер, поли(винил алкохол)</i>	филм	сорпција холестерола		<i>Lopez-de-Dicastillo u cap., 2010; Lopez-de-Dicastillo u cap., 2011a; López-de-Dicastillo u cap., 2011b</i>
<i>поли(винил хлорид)</i>		смањена миграција пластификатора		<i>Chung u cap., 2009</i>

### ***3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО***

---

## 3.1. Материјал

---

### Погача уљане тикве голице

Самлевена погача уљане тикве голице (**PuOC**) добијена је од компаније *Линум доо*, из Чонопље, Србија, која се бави производњом и дистрибуцијом хладно цеђених и мацерираних уља, чувана и складиштена у фрижидеру на 4 °C.

### Етарска уља

Етарска уља (**EO**) ртањског чаја, *Satureja montana* L. (**S. montana**) и босиљка, *Ocimum basilicum* L. (**O. basilicum**), добијени су поступком дестилације из надземног дела (хербе) на *Институту за ратарство и повртарство*, Нови Сад, Србија, одељење у Бачком Петровцу.

### Хемикалије и реагенси

- β-циклодекстрин, 98 % - *Acros Organics*, Кина;
- Tween 20 – *Superlab*, Београд, Србија;
- глицерол молекулске масе 92,1 g/mol - *Lach-Her*, Загреб, Хрватска;
- Зеин, хитозан, желатин тип Б, DPPH радикал, гална киселина, PEG 400, *Folin-Ciocalteu* реагенс, метанол, сирћетна киселина - *Sigma – Aldrich Chemical Co. St. Louise*, САД;
- Скроб – *Palco*, Шабац, Србија;
- дејонизована вода - *Alfanon d.o.o.*, Бачки Петровац, Србија;
- гранулисани натријум-хидроксид - *NPK- Inžinering*, Београд, Србија;
- *Müller-Hinton* агар - *Merck*, Дармстад, Немачка;
- етанол 96 %, - *ZORKA Pharma*, Шабац;
- хранљиви агар, NaCl - *HIMEDIA*, Мумбаи, Индија.

Сви остали реагенси били су аналитичке чистоће.

---

## 3.2. Задачи експерименталног рада

---

На основу постављених циљева рада (Поглавље 1.1.), задачи експерименталних истраживања обухватили су:

### 1. Карактеризацију етарских уља *Satureja montana* L. и *Ocimum basilicum* L.

Детаљна карактеризација етарског уља *S. montana* или *O. basilicum* обухватала је одређивање:

- хемијског састава (гасно-хроматографска (GC/MS) анализа);
- структурних особина (Фурије трансформишућа инфрацрвена спектроскопија (FTIR));
- укупан садржај фенола (Folin-Ciocalte метода);
- антиоксидативне активности (способност неутрализације DPPH радикала, способност неутрализације ОН радикала и редукциона моћ);
- антибактеријске активности (диск-дифузиона метода).

### 2. Добијање и карактеризацију активних филмова на бази погаче уљане тикве голице и етарског уља *S. montana* или *O. basilicum*.

Овај експериментални задатак обухватао је добијање биополимерних активних филмова на бази РuОC са додатком различитих концентрација (1, 2, 3, 4 и 5 % (v/v)) етарског уља *S. montana* (корак 1., Слика 3.1.) или *O. basilicum* (корак 2., Слика 3.1.). Карактеризација добијених активних филмова обухватала је испитивање:

- физичко-механичких особина (дебљина, затезна јачина (TS) и издужење при кидању (EAB));
- физичко-хемијских особина (садржај влаге (MS), укупна растворљивост (TSM) и бубрење);
- баријерних особина (брзина пропустљивости водене паре (WVTR) и пропустљивост (трансмисија) светлости);
- структурних особина (Фурије трансформишућа инфрацрвена спектроскопија (FTIR));
- укупног садржаја фенола (Folin-Ciocalte метода);

- *антиоксидативне активности* (способност неутрализације DPPH радикала, способност неутрализације OH радикала, и редукциона моћ);
- *антибактеријске активности* (диск-дифузиона метода).

### **3. Добијање и карактеризацију инклузионог комплекса $\beta$ -циклодекстрин/етарско уље *S. montana*.**

У предиспитивањима за поступак инкапсулације етарског уља примењена су два инкапсулациона агенса: Tween 20 и  $\beta$ -циклодекстрин. Обзиром да Tween 20 није показао способност инкапсулације (резултати нису приказани у докторској дисертацији), за даље фазе истраживања, као инкапсулациони агенс коришћен је  $\beta$ -циклодекстрин, док је Tween 20 додат код неких биополимерних филмова у циљу постизања бољег емулговања.

За добијање инклузионог комплекса изабрано је етарско уље *S. montana* због добијених нешто бољих резултата код првог задатка експерименталног рада, посебно када су у питању биолошка својства етарских уља, у поређењу са етарским уљем *O. basilicum*.

За синтезу инклузионог комплекса на бази  $\beta$ -циклодекстрина и етарског уља *S. montana* изабрана су три односа, етарско уље:  $\beta$ -циклодекстрин = 10:90; 15:85 и 20:80, док су за сушење добијених инклузионих комплекса коришћене сушница или лиофилизатор (**корак 3., Слика 3.1.**). Добијени инклузиони комплекси су окарактерисани, а испитивана својства обухватала су одређивање:

- *ефикасности инкапсулације* (Folin-Ciocalte метода);
- *структурних особина* (Електрон скенирајућа мискроскопија (SEM) и Фурије трансформишућа инфрацрвена спектроскопија (FTIR)).

### **4. Добијање и карактеризацију активних филмова на бази погаче уљане тикве голице и инклузионог комплекса $\beta$ -циклодекстрин/етарско уље *S. montana*.**

Овај експериментални задатак обухватао је добијање биополимерних активних филмова на бази РцОС са додатком различитих концентрација (1 % и 2 % (g/v)) инклузионог комплекса  $\beta$ -циклодекстрин/етарско уље *S. montana*, добијен односом етарско уље: $\beta$ -циклодекстрин (10:90), сушен поступком



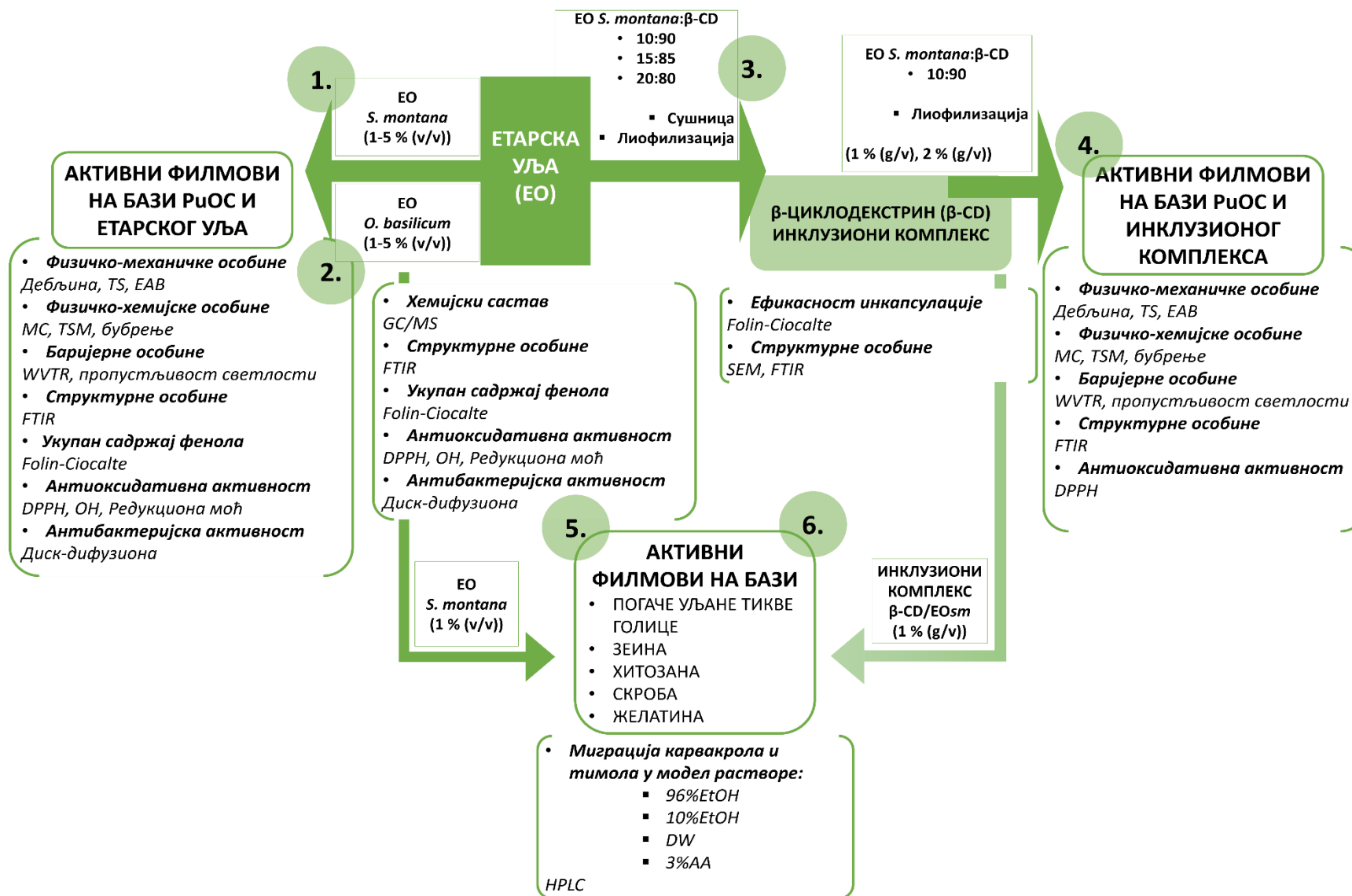
лиофилизације. Карактеризација добијених активних филмова обухватала је испитивање (**корак 4., Слика 3.1.**):

- *физичко-механичких особина* (дебљина, затезна јачина (TS) и издужење при кидању (EAB));
- *физичко-хемијских особина* (садржај воде (MS), укупна растворљивост (TSM) и бубрење);
- *баријерних особина* (брзина пропустљивости водене паре (WVTR) и пропустљивост (трансмисија) светлости);
- *структурних особина* (Фурије трансформишућа инфрацрвена спектроскопија (FTIR));
- *антиоксидативне активности* (способност неутрализације DPPH радикала).

**5. Одређивање миграције карвакрола и тимола из различитих биополимерних активних филмова са етарским уљем *S. montana* или инклузионим комплексом  $\beta$ -циклодекстрин/етарско уље *S. montana*, у различите модел растворе, симулаторе хране.**

У последњој фази истраживања ове докторске дисертације испитана је миграција, садржај карвакрола и тимола, карактеристичних компоненти етарског уља *S. montana*, из различитих биополимерних филмова на бази погаче уљане тикве голице, зеина, хитозана, скроба и желатина, са додатком 1 % етарског уља *S. montana* (**корак 5., Слика 3.1.**), или 1 % инклузионог комплекса  $\beta$ -циклодекстрин/етарско уље *S. montana* (**корак 6., Слика 3.1.**). Миграција ових фенолних компоненти одређена је у четири различита модел раствора (96 % етанол (96%EtOH), 10 % етанол (10%EtOH), дестилована вода (DW) и 3 % сирћетна киселина (3%AA)), симулатора прехранбених намирница.

Детаљан експериментални план истраживања ове докторске дисертације представљен је на **Слици 3.1.**



Слика 3. 1. План експерименталног рада докторске дисертације са означеним корацима (1-6)

---

### 3.3. Карактеризација етарских уља *S. montana* и *O. basilicum*

---

Пре испитивања могућности примене етарског уља *S. montana* и *O. basilicum* за добијање активних биополимерних амбалажних материјала, извршена је њихова карактеризација у виду одређивања:

- хемијског састава;
- структурних особина;
- укупног садржаја фенола;
- антиоксидативне активности;
- антибактеријске активности.

#### Хемијски састав

**Гасно-хроматографска (GC/MS) анализа** коришћена је за одређивање квалитативног и квантитативног садржаја компоненти етарских уља ртањског чаја, *S. montana*, и босилка, *O. basilicum*, применом гасног хроматографа GC 7890B (*Agilent Technologies*, Санта Клара, Калифорнија, САД) повезаног са масеним спектрометром MS 5977A (*Agilent Technologies*, Санта Клара, Калифорнија, САД), коришћењем HP-5MS капиларне колоне, унутрашњег пречника 0,25  $\mu\text{m}$  (*Agilent Technologies*, Санта Клара, Калифорнија, САД). Као гас носач коришћен је хелијум високе чистоће са протоком од 1 mL/min. Ињектор је одржаван на температури од 250 °C. Температура GC пећнице програмирана је на 70 °C, 2 min, праћено постепеним повећањем до 220 °C брзином од 4 °C/min и одржавањем на 220 °C, 10 min. Масени спектрометар је радио у режиму електронске јонизације (70 eV). Прикупљање података је извршено у режиму скенирања (у распону од 50-450 a.m.u – јединица атомске масе, енг. *atomic mass unit*), време одлагања растварача је било 2 min. Узорци су разблажени у хексану у односу 1:10 и 1  $\mu\text{l}$  аликвота је инјектовано у сплит моду са односом 1:80. Идентитет једињења етарских уља добијен је поређењем њиховог индекса задржавања, и масеног спектра са литературним подацима (*Davies, 1990; Adams, 2007*) и базама података *Wiley 10th* (*John Wiley and Sons*, Хобокен, Њу Џерси, САД) и *NIST 2011 MS Library* (*National Institute of Standards and Technology*, Гејтерсбург, Мериленд, САД). Индекси задржавања одређени су у односу на време задржавања низа *n*-алкана са линеарном интерполацијом. Релативни садржај компоненти одређен је методом нормализације подручја, без разматрања фактора одзива. Процент

компоненти рачунат је као средња вредност добијена из две GC–MS анализе, а резултати су приказани табеларно.

**Структурне особине, укупан садржај фенола, антиоксидативна активност и антибактеријска активност** етарских уља *S. montana* и *O. basilicum* описане су у Поглављу 3.6.4., Поглављу 3.6.5., Поглављу 3.6.6. и Поглављу 3.6.7., редом.

---

### 3.4. Добијање и карактеризација инклузионог комплекса $\beta$ -циклодекстрин/етарско уље *S. montana*

---

Након детаљне карактеризације етарских уља *S. montana* и *O. basilicum*, добијени резултати су показали нешто боља биолошка својства етарског уља *S. montana* (**EOsm**), па је из тог разлога ово уље изабрано за испитивање могућности његове инкапсулације у  $\beta$ -циклодекстрин ( **$\beta$ -CD**), односно могућност формирања инклузионог комплекса (**IC**)  $\beta$ -циклодекстрин/етарско уље *S. montana* ( **$\beta$ -CD/EOsm**).

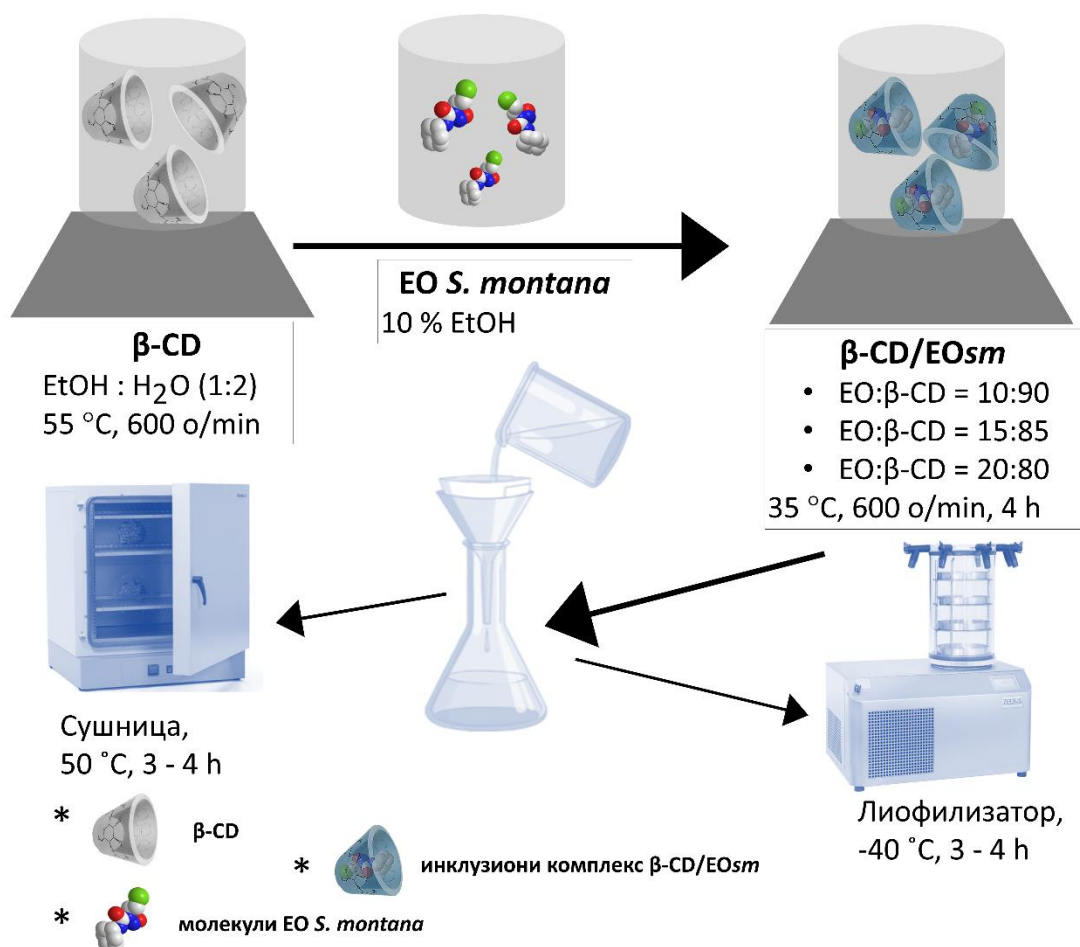
Добијени инклузиони комплекси су окарактерисани, а испитивана својства обухватала су одређивање:

- ефикасност инкапсулације;
- структурне особине.

#### 3.4.1. Добијање инклузионог комплекса

За добијање инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/EOsm, коришћена је метода преципитације према *Bhandari и сар. (1998)*. Поступак добијања инклузионог комплекса дат је на **Слици 3.2.** Прво је припремљена 10 % суспензија  $\beta$ -CD у мешавини етанол (EtOH):вода (H<sub>2</sub>O) - (1:2), мешањем на магнетној мешалици на 55 °C, 600 o/min, до растварања. Раствор је охлађен до температуре око 35 °C, и етарско уље *S. montana*, претходно растворено у 10 % етанолу, је постепено додато, кап по кап, у раствор  $\beta$ -CD, током константног мешања на магнетној мешалици, у различитим концентрацијама како би се добила три различита односа етарског уља (EO) и  $\beta$ -циклодекстрина ( $\beta$ -CD) (**Табела 3.1.**):

- EO: $\beta$ -CD = 10:90;
- EO: $\beta$ -CD = 15:85;
- EO: $\beta$ -CD = 20:80.



Слика 3. 2. Добијање инклузионог комплекса

Добијени раствор је прекривен парафилмом и мешан још 4 h, након чега је чуван у фрижидеру током ноћи. Следећег дана, суспензија је филтрирана, и поново остављена током ноћи у замрзивачу, а након тога осушена користећи две технике. Прва техника је подразумевала сушење у сушници (*Instrumentaria*, Загреб) на 50 °C у току 3 до 4 h, односно док се не добије потпуно сув прах инклузионог комплекса. Друга техника је подразумевала сушење у лабораторијском лиофилизатору, модел *Alpha 2-4 LSC* (*Martin Christ, Osterode am*, Харц, Немачка) на -40 °C, до потпуног сушења (3 – 4 h) Добијени инклузиони комплекси су чувани у замрзивачу на -20 °C, до употребе. Експериментални модел добијања инклузионог комплекса дат је у **Табели 3.1.**

**Табела 3. 1.** Експериментални модел добијања инклузионог комплекса

Узорци	Однос ЕО:β-CD	Поступак сушења
1	10:90	сушница, 50 °C, 3 – 4 h
2	15:85	сушница, 50 °C, 3 – 4 h
3	20:80	сушница, 50 °C, 3 – 4 h
4	10:90	лиофилизација, -40 °C, 3 – 4 h
5	15:85	лиофилизација, -40 °C, 3 – 4 h
6	20:80	лиофилизација, -40 °C, 3 – 4 h

### 3.4.2. Карактеризација инклузионог комплекса

#### Ефикасност инкапсулације

Ефикасност инкапсулације (ЕЕ) инклузионих комплекса, различитих односа ЕО:β-CD (10:90; 15:85; 20:80), добијених помоћу два различита поступка сушења (сушница, лиофилизација) рачуната је одређивањем **укупног садржаја фенола** помоћу *Folin-Ciocalteu* реагенса, према методи описаној код *Tumbas Šaroujas и сар. (2016)*.

Ефикасност инкапсулације добијених инклузионих комплекса испитана је у два различита растварача:

- растварач 1:

Метанол (MeOH): Вода (H<sub>2</sub>O): Сирћетна киселина (AA)=50:42:8;

- растварач 2:

Етанол (EtOH): Метанол (MeOH)=1:1.

Одмерено је 100 mg инклузионог комплекса у 2 mL растварача 1, односно 1 mL растварача 2. Раствори су хомогенизовани на вортексу (*Grant Instruments™ PV-1*, Кембриџ, Велика Британија) током 1 минута, а потом центрифугирани (*Eppendorf*, Немачка) током 2 минуте, на 12 000 о/min. Добијени супернатанти су одвојени, профилирани помоћу филтра величине пора 0,45 μm (*LGI Logistics Group International GmbH*, Херенберг, Немачка), и у 0,1 mL супернатанта је одређен укупан садржај фенола помоћу *Folin-Ciocalteu* методе детаљно описане у **Поглављу 3.6.5.** Ефикасност инкапсулације рачуната је према **једначини 3.1.**:

$$\text{Ефикасност инкапсулације, ЕЕ (\%)} = \frac{\text{TPC}}{\text{IPC}} 100 \quad (\text{ЈЕДН. 3.1.})$$

где ТРС представља укупан садржај фенола у испитиваном супернатанту са узорком, а РС представља почетни садржај фенола, односно укупан садржај фенола у почетној количини етарског уља коришћеној за инкапсулацију.

### **Структурне особине**

**Микроструктура и пречник добијених инклузионих комплекса**, одређени су помоћу **електрон скенирајуће микроскопије (SEM)**, на електронском микроскопу HRSEM JEOL JSM 7600F, при напону убрзања од 20 kV. Узорци су фиксирани на алуминијумским носачима, целофанским тракама и превучени танким слојем злата (20 nm), распршеним по површини узорка. За анализу су коришћена увећања 200x, 500x, 1500x и 3 000x.

**Структурне особине (FTIR спектрометрија)** описане су у **Поглављу 3.6.4..**

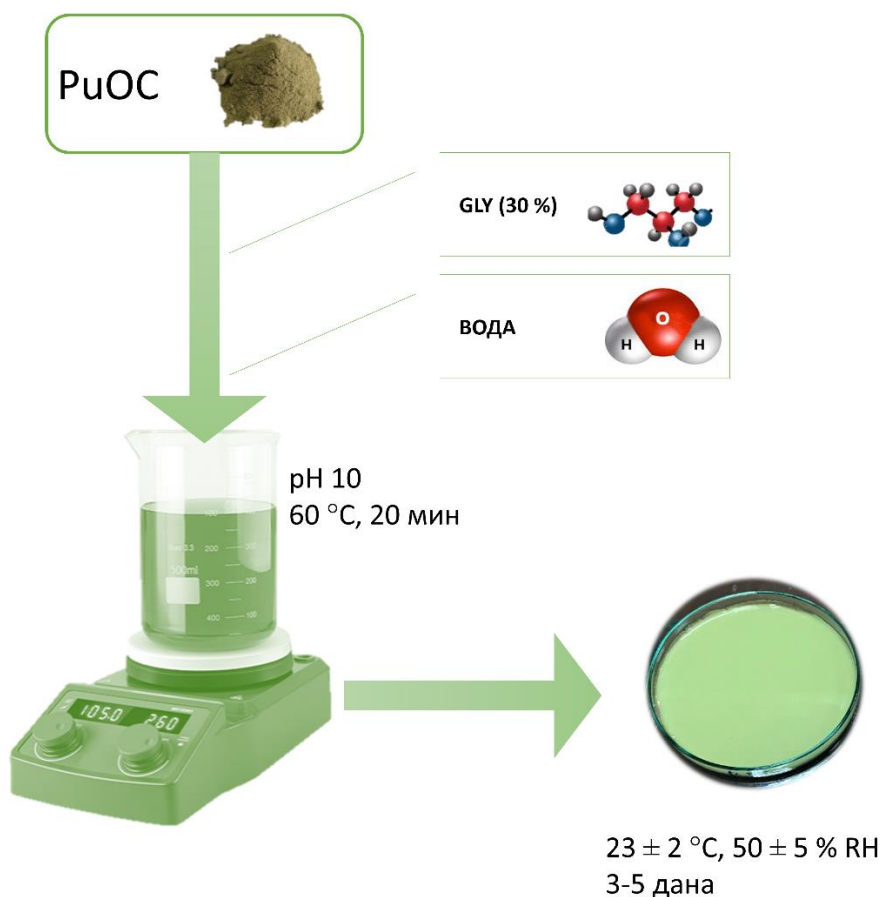


### 3.5. Добијање активних биополимерних филмова

- Након детаљне анализе етарских уља *S. montana* и *O. basilicum*, у даљим истраживањима испитана је могућност инкорпорирања ових етарских уља у биополимерне амбалажне филмове на бази погаче уљане тикве голице, у циљу добијања активних амбалажних материјала. Етарска уља *S. montana* и *O. basilicum* су додата у различитим концентрацијама (1, 2, 3, 4 и 5 % (v/v)) у суспензију филмогеног раствора. Концентрације су одабране на основу добијених претходних резултата за сама етарска уља, посебно оних у вези са њиховом биолошком активношћу (антиоксидативна и антимикробна активност).
- Након детаљне карактеризације добијених инклузионих комплекса на бази  $\beta$ -циклодекстрина и етарског уља *S. montana*, обзиром на добијене резултате, посебно ефикасност инкапсулације, инклузиони комплекс односа ЕО: $\beta$ -CD=10:90, добијен поступком лиофилизације, је одабран за добијање активних биополимерних амбалажних филмова на бази PuOC. У циљу одређивања утицаја инклузионог комплекса на особине биополимерних материјала на бази погаче уљане тикве голице, инклузиони комплекс је додат у филмогени раствор у концентрацији која одговара концентрацији 1 % и 2 % чистог етарског уља *S. montana*, рачунато преко ефикасности инкапсулације. Поред тога, да би се уочио утицај додатка инкапсулационог агенса на особине биополимерних филмова, упоредо су произведени и филмови на бази погаче уљане тикве голице са самим етарским уљем *S. montana* у истим концентрацијама (1 % и 2 %). Праћен је и утицај две различите концентрације глицерола (15 % и 30 %), на добијене филмове.

#### 3.5.1. Добијање активних биополимерних филмова на бази погаче уљане тикве голице

Активни филмови на бази погаче уљане тикве голице (PuOC) добијени су применом *casting* методе (Popović, 2013), а поступак добијања биополимерних филмова дат је на **Слици 3.3.** Прво је припремљена 10 % (m/m) суспензија PuOC у дестилованој води са 30 % глицерола (GLY) (m/m, по маси PuOC), који је коришћен као пластификатор. Добијена суспензија је мешана помоћу магнетне мешалице, а помоћу 50 % раствора NaOH постигнута је рН вредност 10, одређена помоћу рН-метра (Metrohm AG, Швајцарска). Након подешавања рН вредност, суспензија је инкубирана на 60 °C, 20 min, а потом профильтрирана кроз најлонски филтар како би се уклонили нерастворени, крупни делови из погаче.



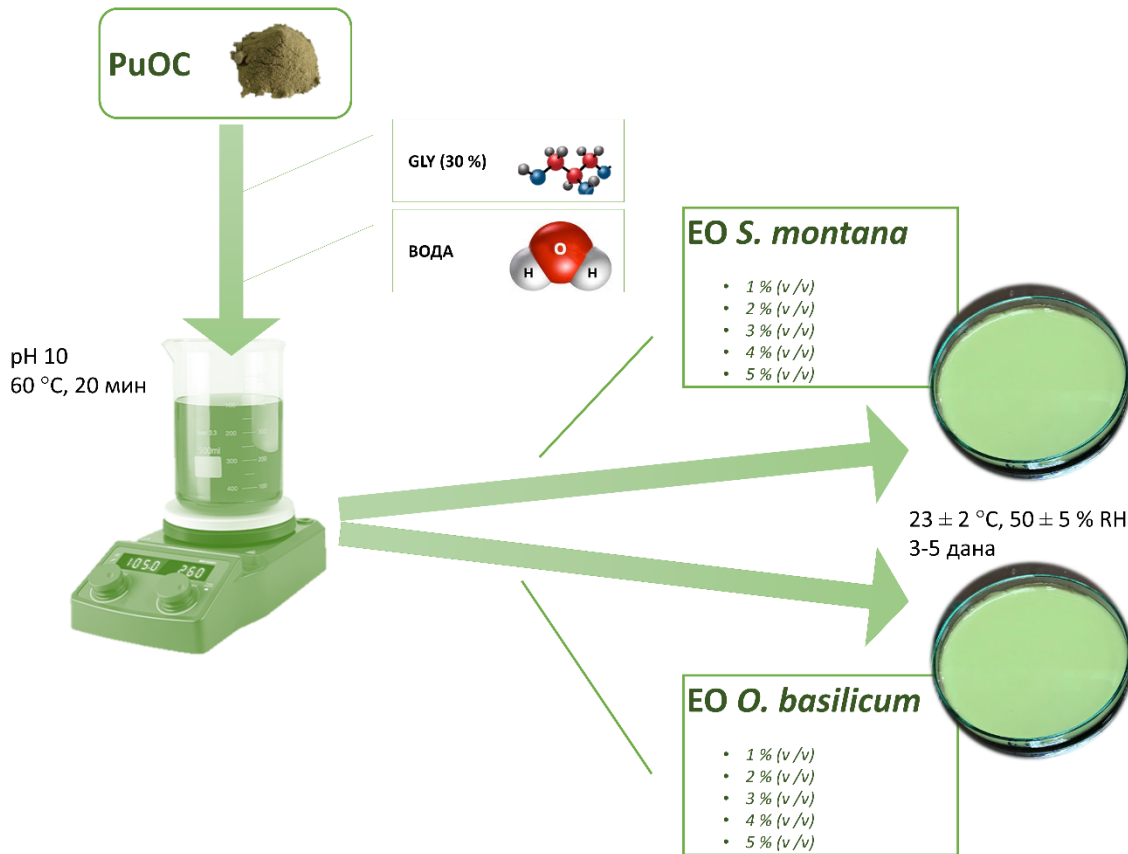
**Слика 3. 3.** Добијање активних биополимерних филмова на бази PuOC

Добијена филмогена суспензија је разливена на Петри плоче облепљене тefлоном, и сушена на собним условима ( $23 \pm 2$  °C,  $50 \pm 5$  % RH) 3 до 5 дана. Након сушења, добијени филмови су скинути са Петри плоча и анализирани.

### 3.5.2. Добијање активних биополимерних филмова на бази погаче уљане тикве голице и етарског уља *S. montana* или *O. basilicum*

Након што је добијена филмогена суспензија на бази погаче уљане тикве голице (PuOC) (Поглавље 3.5.1.), да би се добили активни филмови са етарским уљима, етарско уље *S. montana* или *O. basilicum* у дефинисаним концентрацијама, 1 % (v/v), 2 % (v/v), 3 % (v/v), 4 % (v/v) и 5 % (v/v), су додати у филмогене суспензије. Добијене емулзије су хомогенизоване применом ултратурекса (*SilentCrusher M, Heidolph*, Немачка), на 20 000 o/min, током 2 min, а поступак је поновљен 2 пута, како би се побољшала дисперзија

етарских уља у филмогеном раствору. Поступак добијања активних филмова дат је на **Слици 3.4.**, док је експериментални модел добијања филмова дат у **Табели 3.2.**



**Слика 3. 4.** Добијање активних биополимерних филмова на бази PuOC и етарског уља *S. montana* или *O. basilicum*

Добијена филмогена емулзија је разливена на Петри плоче облепљене тефлоном, и сушена на собним условима ( $23 \pm 2$  °C,  $50 \pm 5$  % RH) 3 до 5 дана. Након сушења, добијени филмови су скинути са Петри плоча и анализирани. Филмови без додатка етарских уља коришћени су као **контрола**.

**Табела 3. 2.** Експериментални модел добијања активних биополимерних филмова на бази РuОС и етарског уља *S. montana* или *O. basilicum*

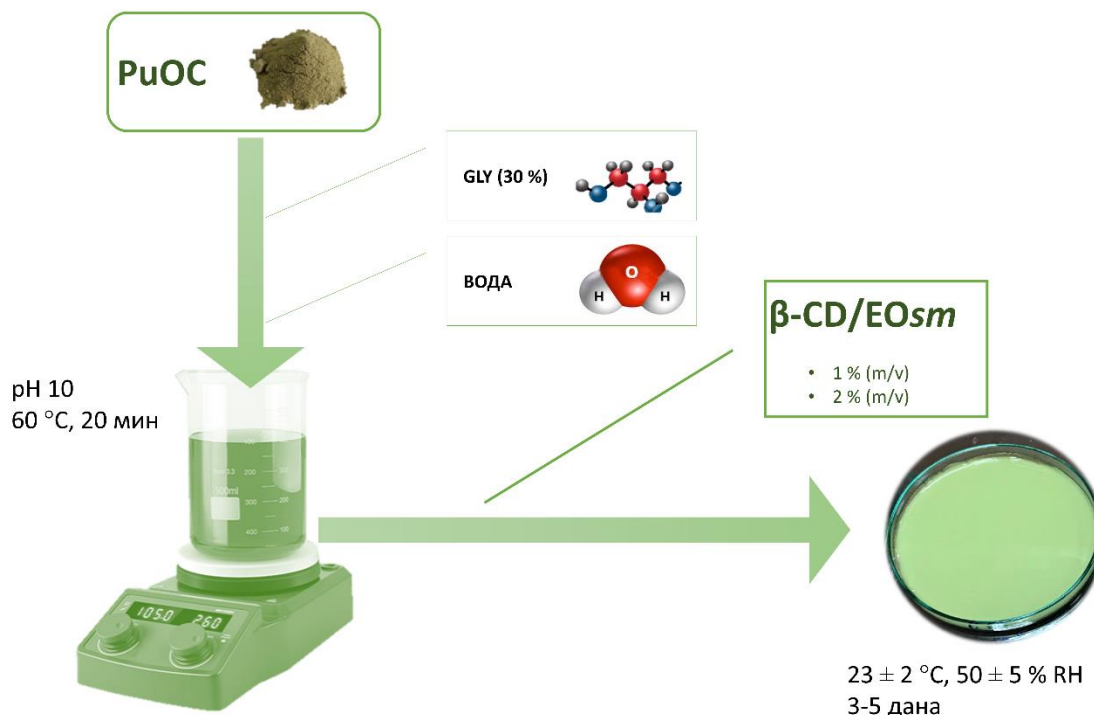
Узорци	Концентрација ЕО <i>S. montana</i> , % (v/v)	Концентрација ЕО <i>O. basilicum</i> , % (v/v)
контрола	0	0
1	1	0
2	2	0
3	3	0
4	4	0
5	5	0
6	0	1
7	0	2
8	0	3
9	0	4
10	0	5

### 3.5.3. Добијање активних биополимерних филмова на бази погаче уљане тикве голице и инклузионог комплекса

Филмогена суспензија на бази РuОС припремљена је према поступку описаном у **Поглављу 3.5.1.** Експеримент је проширен применом још једне концентрације коришћеног пластификатора глицерола (GLY), 15 % (m/m, по маси РuОС), за добијање активних филмова на бази погаче уљане тикве голице.

Добијање активни филмови на бази РuОС и инклузионог комплекса, обухватала је инкорпорирање инклузионог комплекса  $\beta$ -циклодекстрин/етарско уље *S. montana* ( $\beta$ -CD/EO<sub>sm</sub>) (однос ЕО: $\beta$ -CD=10:90, сушен лиофилизацијом) (**Поглавље 3.4.1.**). Инклузиони комплекс је додат у филмогену суспензију у концентрацијама које одговарају концентрацији 1 % и 2 % самог етарског уља, а израчунате преко ефикасности инкапсулације. Инклузиони комплекс  $\beta$ -CD/EO<sub>sm</sub> добијен односом ЕО: $\beta$ -CD=10:90, и поступком лиофилизације, је одабран за синтезу активних биополимерних филмова на бази РuОС, на основу добијених резултата ефикасности инкапсулације. Суспензије су хомогенизоване на магнетној мешалици, на 700 о/min, током 6 min. Ради поређења особина са активним филмовима на бази РuОС и самог етарског уља *S. montana*, паралелно су синтетисани и ови филмови са одговарајућим концентрацијама етарског уља (1 % (v/v) и 2 % (v/v)), према поступку описаном у **Поглављу 3.5.2.** Поступак добијања активних биополимерних филмова дат је на **Слици 3.5.**, а експериментални модел у **Табели 3.3.**

Добијена филмогена суспензија је разливена на Петри плоче облепљене тефлоном, и сушена на собним условима ( $23 \pm 2$  °C,  $50 \pm 5$  % RH) 3 до 5 дана. Након сушења, добијени филмови су скинути са Петри плоча и анализирани. Филмови без додатка активних једињења, етарског уља и инклузионог комплекса, коришћени су као **контрола**.



**Слика 3. 5.** Добијање активних биополимерних филмова на бази PuOC и инклузионог комплекса

**Табела 3. 3.** Експериментални модел добијања активних биополимерних филмова на бази PuOC и етарског уља *S. montana* или инклузионог комплекса

Узорци	Концентрација EO <i>S. montana</i> , % (v/v)	Концентрација β-CD/EOsm, % (m/v)	Концентрација GLY, % (m/m)
контрола	0	0	15
контрола	0	0	30
1	1	0	15
2	1	0	30
3	2	0	15
4	2	0	30
5	0	1	15
6	0	1	30
7	0	2	15
8	0	2	30

### 3.5.4. Добијање активних биополимерних филмова на бази зеина, хитозана, скроба и желатина, и етарског уља *S. montana* или инклузионог комплекса

**Филмогени раствор зеина** (10 % (m/v)) припремљен је суспендовањем зеина у 85 % етанолу уз додаток пластификатора PEG 400 (полиетилен гликол 400) (50 % (m/m), по маси зеина). Раствор је потом инкубиран на 80 °C, пар минута, до потпуног растварања зеина.

**Филмогени раствор хитозана** ниског вискозитета, припремљен је растварањем 1 % (w/v) хитозана у 1 % (v/v) раствору сирћетне киселине, мешањем на магнетној мешалици у току 24 h. Након мешања, раствор је филтриран применом вакуум филтрације да би се уклониле заостале нерастворене честице (Hromiš, 2015).

**Филмогени раствори скроба** добијени су растварањем 1,5 % (m/v) скроба у дестилованој води. Раствор је загреван на 90 °C у трајању од 60 минута, у воденом купатилу. Глицерол, као пластификатор, је додат у филмогену суспензију у количини од 40 % (m/m) рачунато на масу скроба. Након додатка глицерола, раствор је загреван још 10 минута (Шупут, 2016).

**Филмогени раствор желатина**, тип Б (10 % (m/v)) припремљен је у дестилованој води, и остављен да гелира на собној температури, у току 30 минута. Потом је раствор инкубиран на 50 °C, током 20 минута, како би се желатин растворио. У топао раствор додато је 20 % (m/m, по маси желатина) глицерола, коришћеног као пластификатор.

Да би се добили активни филмови **на бази зеина, хитозана, скроба и желатина са етарским уљем *S. montana***, етарско уље је додато у дефинисаној концентрацији (1 % (v/v)), у охлађене филмогене растворе, хомогенизоване ултратуреком (*SilentCrusher M, Heidolph*, Немачка), 20 000 o/min, 2 min, а поступак је поновљен 2 пута. Ради бољег емулговања етарског уља, у филмогене суспензије на бази хитозана и скроба, додат је и Tween 20 (2 %, v/v).

Како би се добили активни филмови **на бази зеина, хитозана, скроба и желатина са инклузионим комплексом  $\beta$ -CD/EOsm**, инклузиони комплекс је додат у охлађен филмогене растворе у концентрацији која одговара 1 % (m/v) неинкапсулираног етарског уља, рачунато преко добијених вредности ефикасности инкапсулације. Суспензије су хомогенизоване на магнетној мешалици, на 700 o/min, током 6 min.

Добијене филмогене емулзије и суспензије су разливане на Петри плоче облепљене тефлоном, и сушена на собним условима (23 ± 2 °C, 50 ± 5 % RH) 3 до 5 дана.

---

## 3.6. Карактеризација активних биополимерних филмова

---

Добијени активни филмови су, пре почетка анализирања механичких, физичко-хемијских, баријерних, структурних и биолошких особина, посматрани и описани. Дефинисана је боја, мирис и структура површине филма, као и могуће неправилности и недостаци. Посматран је утицај додатка различитих етарских уља и додатка инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/EOSm, као и различитих концентрација (1 – 5 % (v/v)) додатих етарских уља и инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/EOSm (1 % (m/v) и 2 % (m/v)), на карактеристике добијених филмова на бази РuОС.

- Добијени активни филмови су окарактерисани одређивањем:
  - физичко-механичких особина;
  - физичко-хемијских особина;
  - баријерних особина;
  - структурних особина;
  - укупног садржаја фенола;
  - антиоксидативне активности;
  - антибактеријске активности.

### 3.6.1. Физичко-механичке особине

**Дебљина филмова** мерена је употребом дигиталног микрометра (Type 30, Tesa, Швајцарска), са осетљивошћу од 0,001 mm. Дебљина узорка мерена је на 15 различитих позиција на узорцима филмова.

Резултати су дати као средња вредност минимално пет узорка истог материјала  $\pm$  стандардна девијација (SD), и приказани табеларно.

**Затезна јачина (TS) и издужење при кидању (EAB)** мерени су на уређају *Instron Universal Testing Instrument Model No 4301* (Instron Engineering Corp., Canton, MA), према ASTM стандардној методи (ASTM, 2010). Узорци филма сечени су у правоугаоне епрувете дужине 80 mm и ширине 15 mm. Почетни размак између клема инструмента подешен је на 50 mm, док је брзина подешена на 50 mm/min.

Вредност затезне јачине рачуната је као однос максималне силе коју филм трпи пре кидања и попречног пресека филма на који делује сила, и изражена је у МПа. Вредност

издужења при кидању рачуната је као однос дужине узорка пре и после деловања максималне силе, у тренутку кидања узорка, и изражена је као проценат издужења (%). Затезна јачина и издужење при кидању изражени су као средње вредности минимално пет узорака истог материјала  $\pm$  SD, и приказани табеларно или графички.

### 3.6.2. Физичко-хемијске особине

Физичко-хемијске особине су одређене према модификованим методама које су детаљно описали *Porović (2013)*, *Hromiš (2015)* и *Шупут (2016)*.

За одређивање **садржаја воде (МС)** узорци филмова (2 x 2) cm измерени су на аналитичкој ваги ( $m_1$ ) и сушени на  $(103 \pm 2)$  °C у сушници (*Instrumentaria*, Загреб), до константне масе, након чега им је поново измерена маса ( $m_2$ ). Садржај воде је одређен као проценат губитка почетне масе филма, након сушења, а резултат је изражен као средња вредност три независна мерења  $\pm$  SD, за сваки узорак, на масу влажног узорка, према **једначини 3.2.**):

$$\text{Садржај воде, МС (\%)} = \frac{(m_1 - m_2)}{m_1} 100 \quad (\text{ЈЕДН. 3.2.})$$

Резултати су приказани табеларно.

За одређивање **укупне растворљивости (TSM)**, узорци филмова димензија (2x2) cm су прво осушени у сушници (*Instrumentaria*, Загреб) на  $(103 \pm 2)$  °C до константне масе и измерени на аналитичкој ваги, чиме је добијена почетна сува материја филмова ( $m_1$ ). Након мерења сваки филм је остављен у посуди са 50 mL дестиловане воде, током 24 сата, на собним условима, уз повремено мућкање. Након 24 сата, вода је декантована а филмови су поново осушени у сушници (*Instrumentaria*, Загреб) на  $(103 \pm 2)$  °C до константне масе. Измерена маса на аналитичкој ваги представља суву материју филма након растварања ( $m_2$ ). Укупна растворљивост филмова (%) израчуната је према **једначини 3.3.**:

$$\text{Укупна растворљивост филмова, TSM (\%)} = \frac{(m_1 - m_2)}{m_1} 100 \quad (\text{ЈЕДН. 3.3.})$$

где  $m_1$  представља суву материју филма пре растварања у води, а  $m_2$  сува материја филма након растварања у води. Тест за одређивање укупне растворљивости урађен је у три независна понављања, а резултат дат као средња вредност  $\pm$  SD. Резултати су приказани табеларно.

Приликом одређивања **способности бубрења**, узорци филмова димензија (1 x 2) cm, измерени су на аналитичкој ваги ( $m_1$ ), а затим су уроњени у посуду са 25 mL дестиловане воде, 2 минуте уз мућкање. Вода је декантована а вишак воде са узорка је



уклоњен филтер папиром, и измерена је нова маса узорка ( $m_2$ ). Количина апсорбоване воде рачуната је према **једначини 3.4.**:

$$\text{Способност бубрење (\%)} = \frac{(m_2 - m_1)}{m_1} 100 \quad (\text{ЈЕДН. 3.4.})$$

где  $m_2$  и  $m_1$  представљају масе влажног и сувог узорка, редом. За сваки узорак тест је поновљен минимум три пута, а степен бубрења узорка изражен је као средња вредност понављања једног узорка  $\pm$  SD. Резултати су приказани табеларно.

### 3.6.3. Баријерне особине

**Брзина пропустљивости водене паре (WVTR)** добијених биополимерних филмова одређена је гравиметријском методом (*dish method*) на основу ISO стандардне методе (*ISO 2528, 1995*). Анхидровани силика гел је коришћен као десикант у тест посудницама. На посудницу се поставља узорак филма, херметички затвара и овако припремљен узорак оставља се у ексикатор са засићеним раствором калијум нитрата, при датим условима  $t = 25\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$  и  $RH = 90\% \pm 2\%$ . Маса силика гела мерена је након сваких сат времена, до 5 сати. Брзина преноса водене паре кроз узорак рачуната је као однос разлике маса силика гела пре и после третмана (апсорбована влага) и површине узорка филма и изражена у  $\text{g/m}^2\text{h}$ . За сваки узорак урађене су по три пробе, а резултат је изражен као средња вредност  $\pm$  SD. Резултати су приказани графички.

**Пропустљивост (трансмисија) светлости** (видљивог и UV) дела спектра светлости кроз филмове одређена је помоћу T80+ UV/VIS спектрофотометра (*PG instruments LTD, Лутервортх, УК*), у опсегу таласних дужина од 200 nm до 800 nm, а тачке мерења су извршене на сваких 5 nm. Резултати су приказани графички.

### 3.6.4. Структурне особине

**Фурије трансформишућа инфрацрвена спектроскопија, FTIR** спектри етарских уља, инклузионих комплекса и активних филмова на бази  $\text{PuOC}$ , су снимљени на собној температури на уређају Nicolet IS10 FT-IR спектрофотометар (*Thermo Fisher Scientific, МА, САД*) према методи *ASTM D5576:00 (2013)*. Сви спектри су снимљени у спектралном опсегу  $4000\text{--}500\text{ cm}^{-1}$ , при резолуцији од  $4\text{ cm}^{-1}$ . Сваки узорак скениран је 16 пута, док је слепа проба (*background*) снимљена пре анализе сваког узорка. Софтвер *Omnice 8.1. (Thermo Fisher Scientific, МА, САД)* је коришћен за прикупљање, управљање и обраду FTIR спектра. Добијени резултати су приказани графички.

### 3.6.5. Укупан садржај фенола

**Укупан садржај фенола (TPC)** у етарским уљима и активним биополимерним филмовима на бази PuOC, одређен је користећи *Folin-Ciocalteu* реагенс и галну киселину као стандард (*Singelton u Rosi, 1965*).

Узорци су припремљени на следећи начин

- 0,1 mL припремљеног етанолног раствора етарских уља у испитиваним концентрацијама (1-5 % (v/v));
- активни биополимерни филмови на бази PuOC, димензија 10x10 mm;
- слепа проба за етарска уља - 0,1 mL дестиловане воде;
- слепа проба за активне филмове – без узорка.

Реакциона смеша је припремљена мешањем узорка са 7,9 mL дестиловане воде, 0,5 mL *Folin-Ciocalteu* реагенса и 1,5 mL 20 % натријум-карбоната. Након инкубације од 2 h на собној температури, измерена је апсорбанца испитиване смеше на спектрофотометру (*JENWAY 6300*, УК), на таласној дужини од 750 nm. Исти принцип примењен је за стандардне растворе галне киселине у циљу добијања калибрационе криве. Једначина добијене стандардне криве била је (**једначина 3.5.**):

$$y \text{ (апсорбанца)} = 9,582x + 0,0585, R^2 = 0,9961 \quad \text{(ЈЕДН. 3.5.)}$$

Добијене вредности апсорбанце су уврштене у ову једначину, и укупан садржај фенолних компоненти је израчунат, и изражен као mg еквивалента галне киселине по mL узорка (mg GK/mL) за етарска уља, односно као mg еквивалента галне киселине по g узорка (mg GK/g) за активне филмове. Резултати су дати као средња вредност три мерења  $\pm$  SD, и приказани табеларно.

### 3.6.6. Антиоксидативна активност

**Способност неутрализације DPPH радикала** је спроведена на основу процедуре дате према *Morales u Jimenez-Perez (2001)*.

Узорци су припремљени на следећи начин:

- 0,1 mL етанолног раствора етарских уља у испитиваним концентрацијама (1-5 % (v/v));
- 0,008 g или 0,016 g инклузионог комплекса, односно количина инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/EOsm која одговара концентрацији чистог

етарског уља од 1 % и 2 %, редом, а одређена преко добијених резултата ефикасности инкапсулације;

- активни биополимерни филмови на бази  $PuOC$ , димензија 10x10 mm;
- слепа проба за етарска уља - 0,1 mL дестиловане воде;
- слепа проба за инклузиони комплекс - без узорка;
- слепа проба за активне филмове – без узорка.

Након припреме узорци су мешани са 4,8 mL етанолног раствора DPPH (80  $\mu M$ ), и остављени на шејкеру (*Heidolph Unimax 1010*, Немачка), у мраку, током 24 сата. Апсорбанце су мерене на спектрофотометру (*JENWAY 6300*, УК), на таласној дужини од 515 nm, а способност неутрализације DPPH радикала узорака одређена је према датом једначини 3.6.):

$$\text{Способност неутрализације DPPH радикала (\%)} = \frac{A_{\text{слепа проба}} - A_{\text{узорка}}}{A_{\text{слепа проба}}} 100 \quad (\text{ЈЕДН. 3.6.})$$

где  $A_{\text{слепа проба}}$  представља измерену апсорбанцу етанолног DPPH раствора слепа проба, а  $A_{\text{узорка}}$  представља измерену апсорбанцу етанолног раствора DPPH са испитиваним узорком. Резултати су дати као средња вредност три мерења  $\pm SD$ , и приказани табеларно.

**Способност неутрализације ОН радикала** спроведена је на основу процедуре према *Deeseenthum and Pejovic (2010)*.

Узорци су припремљени на следећи начин:

- 0,1 mL етанолног раствора етарских уља у испитиваним концентрацијама (1-5 % (v/v));
- активни биополимерни филмови на бази  $PuOC$ , димензија 5x5 mm;
- слепа проба за етарска уља - 0,1 mL дестиловане воде;
- слепа проба за активне филмове – без узорка.

Сваки узорак помешан је са 0,9 mL натријум фосфатног пуфера (0,2 M, pH7), 0,3 mL 2-дезоксирибозе (10 mM), 0,3 mL EDTA (10 mM), 0,3 mL  $FeSO_4$  (10 mM), 0,3 mL водоник пероксида (10 mM) и 1 mL дестиловане воде. Након тога, узорци су инкубирани на 37 °C, 1 сат, после чега је додато 1,5 mL трихлорсирћетне киселине (2,8 %) и 1,5 mL тиобарбитурне киселине (0,1 %). Узорци су загревани у кључалој води 10 минута, и након хлађења центрифугирани (*Tehtnica*, Железници) на 3000 o/min, 10 min. Апсорбанце су мерене на спектрофотометру (*JENWAY 6300*, УК), таласној дужини од 520 nm, а способност неутрализације ОН радикала испитиваних узорака одређена је према датом једначини 3.7.):

$$\text{Способност неутрализације ОН радикала (\%)} = \frac{A_{\text{слепа проба}} - A_{\text{узорка}}}{A_{\text{слепа проба}}} 100 \quad (\text{ЈЕДН. 3.7.})$$

где  $A_{\text{слепа проба}}$  представља измерену апсорбанцу реакционог раствора слепа проба, а  $A_{\text{узорка}}$  представља измерену апсорбанцу реакционог раствора са испитиваним узорком. Резултати су дати као средња вредност три мерења  $\pm$  SD, и приказани табеларно.

Одређивање **редукционе моћи** узорака спроведено је спрам процедуре дате према *Moradi u sar. (2012)*.

Узорци су припремљени на следећи начин

- 0,1 mL етанолног раствора етарских уља у испитиваним концентрацијама (1-5 % (v/v));
- активни биополимерни филмови на бази  $PuOC$ , димензија 10x10 mm;
- слепа проба за етарска уља - 0,1 mL дестиловане воде;
- слепа проба за активне филмове – без узорка.

Сваки узорак помешан је са 2,5 mL фосфатног пуфера (0,2 M, pH 6,6) и 2,5 mL калијум ферицијанида (1 %). Реакциона смеша је инкубирана на 50 °C, 3 сата. Након инкубације додато је 2,5 mL трихлорсирћетне киселине (100 g/L) и центрифугирано на 3000 o/min (*Tehnica*, Железники), 10 минута. Након центрифугирања, 2,5 mL добијеног супернатанта је одвојено и помешано са 2,5 mL дестиловане воде и 0,5 mL  $FeCl_3$  (1 g/L). Апсорбанце су мерене на спектрофотометру (*JENWAY 6300*, УК), таласној дужини од 700 nm, а веће апсорбанце реакционе смеше указују на повећање редукционе моћи испитиваних узорака. Резултати су дати као средња вредност три мерења  $\pm$  SD, и приказани табеларно.

### 3.6.7. Антибактеријска активност

Антибактеријска активност узорака одређена је применом **диск-дифузионе методе** (*Leboffe u Pierce, 2005*). За испитивање је изабрано 5 бактеријских сојева: *Escherichia coli*, ATCC 25922, и *Salmonella enterica* субсп. *enterica* серотип Enteritidis (група D) ATCC 13076, као представници грам-негативних бактерија; и *Listeria monocytogenes*, ATCC 19111, *Bacillus cereus*, ATCC 11778, *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923 као представници грам-позитивних бактерија. Сви бактеријски сојеви су култивисани на 37 °C, 24 сата на хранљивом агару. Након инкубације, припремљена је бактеријска суспензија од  $10^8$  cfu/mL, у 9 mL стерилног физиолошког раствора (0,85 % NaCl раствор), одређена помоћу *McFarland* нефелометра (*SIA BIOSAN*, Летонија). Потом је припремљена серија децималних разређења у физиолошком раствору како би се добила бактеријска суспензија од  $10^6$  cfu/mL. Плоче са *Müller-Hinton* агаром су припремљене разливањем 15 mL отопљеног *Müller-Hinton* агара, 45 °C, у Петри плоче пречника 90-mm, и остављене да се стврду. Након тога, стерилни брис је уроњен у припремљену бактеријску суспензију и инокулисана је цела површина *Müller-Hinton* агара.

Узорци су припремљени на следећи начин:

- 0,1 mL DMSO (диметил сулфоксид) раствора етарских уља у испитиваним концентрацијама (1-5 % (v/v)), нанешене су на стерилне дискове, пречника 6 mm (*HIMEDIA*, Мумбаи, Индија), постављени на централни део инокулисаног *Müller-Hinton* агара на Петри плочама;
- активни биополимерни филмови на бази  $PuOC$ , кружног облика пречника 6 mm, исечени су помоћу стерилног кружног ножа, претходно стерилисани под UV лампом, а потом постављени на централни део инокулисаног *Müller-Hinton* агара на Петри плочама.

Петри плоче су затворене парафилмом и инкубирани у термостату (*Сутјеска*, Београд, Србија) на 37 °C, 24 часа. Пречници добијених инхибиторних зона изражене су у милиметрима. Резултати су дати као средња вредност три мерења  $\pm$  SD, и приказани табеларно.

---

### 3.7. Одређивање миграције карвакрола и тимола из биополимерних активних филмова са етарским уљем *S. montana* или инклузионим комплексом у модел растворе

---

Миграција карвакрола и тимола из различитих биополимерних активних материјала са етарским уљем *S. montana* или инклузионим комплексом  $\beta$ -CD/EOsm, у четири различита модел раствора, симулатора прехранбених намирница, одређена је помоћу HPLC уређаја, применом *Shimadzu Prominence* хроматографског система повезаног са UV/Vis детектором (*Shimadzu, Kyoto, Japan*). Раздвајање је извршено на *Luna 5  $\mu$ m C-18 RP* колони, 250  $\times$  4,6 mm (*Phenomenex, Torrance, CA, САД*), са заштитном колоном C18, 4  $\times$  30 mm (*Phenomenex; Torrance, CA, САД*). Две мобилне фазе, А (ацетонитрил) и Б (1 % мравља киселина), коришћене су при брзинама протока од 1 ml/ min са следећим градијентним профилем: 0–10 мин од 10 % до 25 % А, 10–20 мин линеарни пораст до 60 % А и 20–30 мин линеарни пораст до 70 % А, праћен преокретом од 10 мин до почетних 10 % А са додатних 5 мин времена у равнотежења. Референтне супстанце су растворене у 50 % етанолу.

Одређена је миграција карвакрола и тимола из 5 различитих биополимерних филмова, на бази:

- РцОС,
- зеина,
- хитозана,
- скроба и
- желатина,

са 1 % етарског уља *S. montana*, или 1 % инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/EOsm. Испитивање је извршено методом урањања према стандардној методи *BS EN 1186-1 (2002)*, у четири различита модел раствора, симулатора хране:

- **А:** 96 % етанолни раствор (96%EtOH), симулатор масних намирница;
- **В:** 10 % етанолни раствор (10%EtOH), симулатор алкохолних намирница;
- **С:** дестилована вода (DW), симулатор природних намирница;
- **Д:** 3 % сирћетна киселина (3%AA), симулатор киселих намирница.

Поред активних биополимерних филмова, одређена је и миграција карвакрола и тимола из самог инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/EOsm у сва 4 модел раствора.

Узорци су припремљени на следећи начин:

- активни биополимерни филмови, димензија 10x10 mm;
- 0,008 g инклузионог комплекса, односно количина инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/EOsm која одговара концентрацији од 1 % чистог етарског уља одређена преко добијених резултата ефикасности инкапсулације;

и помешани са 1 mL одговарајућег модел раствора, хомогенизовани на вортексу (*Grant Instruments™ PV-1*, Кембриџ, Велика Британија) током 1 минута, потом остављени на ултразвучном купатилу (*Elmasonic, model P-30H*, Немачка) током 20 минута. Узорци су центрифугирани (*Eppendorf*, Немачка) на 10 000 o/min, у току 3 мин, и профилтрирани кроз филтар пречника 0,45  $\mu$ m (*LGI Logistics Group International GmbH*, Херенберг, Немачка). Поступак је поновљен два пута. 10  $\mu$ L добијеног узорка је коришћено за анализу. Узорци су изражени као mg/g филма, односно mg/g инклузионог комплекса. Експериментални модел испитивања дат је у **Табели 3.4.**

**Табела 3. 4.** Експериментални модел одређивања миграције карвакрола и тимола из различитих биополимерних активних материјала у различите симулаторе хране

Узорци	Сировина	Концентрација ЕО <i>S. montana</i> , % (v/v)	Концентрација $\beta$ - CD/EOsm, % (m/v)	Симулатор хране
1	РuОС	1	0	А
2	РuОС	1	0	В
3	РuОС	1	0	С
4	РuОС	1	0	Д
5	РuОС	0	1	А
6	РuОС	0	1	В
7	РuОС	0	1	С
8	РuОС	0	1	Д
9	зеин	1	0	А
10	зеин	1	0	В
11	зеин	1	0	С
12	зеин	1	0	Д
13	зеин	0	1	А
14	зеин	0	1	В
15	зеин	0	1	С
16	зеин	0	1	Д
17	хитозан	1	0	А
18	хитозан	1	0	В
19	хитозан	1	0	С
20	хитозан	1	0	Д

21	хитозан	0	1	A
22	хитозан	0	1	B
23	хитозан	0	1	C
24	хитозан	0	1	D
25	скроб	1	0	A
26	скроб	1	0	B
27	скроб	1	0	C
28	скроб	1	0	D
29	скроб	0	1	A
30	скроб	0	1	B
31	скроб	0	1	C
32	скроб	0	1	D
33	желатин	1	0	A
34	желатин	1	0	B
35	желатин	1	0	C
36	желатин	1	0	D
37	желатин	0	1	A
38	желатин	0	1	B
39	желатин	0	1	C
40	желатин	0	1	D
41	$\beta$ -CD/EOsm	0	1	A
42	$\beta$ -CD/EOsm	0	1	B
43	$\beta$ -CD/EOsm	0	1	C
44	$\beta$ -CD/EOsm	0	1	D



### 3.8. Методе статистичке обраде података

#### Метода вештачке неуронске мреже

За израду модела коришћен је вишеслојни перцептрон модел (енг. *Multi-Layer Perceptron*, MLP), који се састојао од три слоја (улазни, скривени и излазни). Овај модел се показао способним за апроксимацију нелинеарних функција (*Grieu u cap., 2011*). Пре израчунавања, улазни и излазни подаци су нормализовани како би се побољшало понашање вештачке неуронске мреже (*artificial neural network* - ANN). Током циклуса учења, улазни параметри су више пута презентовани мрежи (*Pezo u cap., 2013*). *Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno* (BFGS) алгоритам коришћен је као итеративна метода за решавање нелинеарне оптимизације током ANN моделовања. Експериментална база података за моделовање ANN била је насумично подељена на податке за учење, унакрасну валидацију и тестирање са 60 %, 20 % и 20 % експерименталних података, редом. Скуп података за учење коришћен је за циклус учења ANN, као и за процену оптималног броја неурона у скривеном слоју и тежинских коефицијента сваког неурона у мрежи. Скуп података о унакрасној валидацији коришћен је за тестирање перформанси мреже, док је тестирање било у току као показатељ нивоа уопштавања и времена у којем је мрежа почела да се дивергира.

Коефицијенти повезани са скривеним и излазним слојем (тежински коефицијенти (енг. *weights*) и нулти чланови (енг. *biases*)) груписани су у матрице  $W_1$  и  $B_1$ , и  $W_2$  и  $B_2$ , редом. Модел неуронске мреже може да се напише коришћењем матричног записа ( $Y$  је матрица излазних променљивих,  $f_1$  и  $f_2$  су преносне функције у скривеном односно излазном слоју, а  $X$  је матрица улазних променљивих) (*Trelea u cap., 1997*) (**једначина 3.8.**):

$$Y = f_1(W_2 \cdot f_2(W_1 \cdot X + B_1) + B_2) \quad (\text{ЈЕДН. 3.8.})$$

Тежински коефицијенти (елементи матрице  $W_1$  и  $W_2$ ) одређени су током циклуса ANN учења, који их ажурира користећи процедуре оптимизације како би се умањиле грешке између излаза неуронске мреже и експерименталних података (*Trelea u cap., 1997*; *Basheer u Hajmeer, 2001*) на основу збира квадрата (SOS) и BFGS алгоритма, који се користе за убрзавање и стабилизацију конвергенције. Коефицијенти детерминације коришћени су као параметри за проверу перформанси добијеног ANN модела

### **Анализа глобалне осетљивости**

*Yoon*-ова метода интерпретације је коришћена за одређивање релативног утицаја врсте сушења, врсте растварача и односа етарског уља и  $\beta$ -циклодекстрина на ефикасност инкапсулације добијених инклузионих комплекса  $\beta$ -CD/*EOsm* (Поглавље 3.4.2.); као и утицај биополимерног филма, врсте модел раствора (симулатора хране) на миграцију карвакрола и тимола (Поглавље 3.7.) (*Yoon и сар., 1993*). Ова метода је примењена на основу тежинских коефицијената развијене ANN.

### **Статистичка обрада података**

За обраду експерименталних података коришћени су програми *Microsoft Excel* и *Statistica 13.5.0.17* (*StatSoft, Талса, Оклахома, САД*). Резултати су статистички тестирани анализом варијансе (енг. *Analysis of Variance, ANOVA*), а статистичка значајност између средњих мерења  $\pm$  SD одређена је са 95 % вероватноће ( $p < 0,05$ ) применом *Tukey*'евог *HSD* теста.

## ***4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА***

---

## 4.1. Карактеризација етарских уља *S. montana* и *O. basilicum*

---

Етарско уље ртањског чаја, *S. montana* је било интензивне жуте боје, и јаког ароматичног мириса, који подсећа на етарско уље оригана и мајчине душице, највероватније због јаког фенолног карактера и сличног хемијског састава. Етарско уље босиљка, *O. basilicum* је било безбојно, и јаког ароматичног мириса.

Карактеризација етарских уља ртањског чаја, *S. montana* и босиљка, *O. basilicum*, извршена је одређивањем хемијског састава, структурних особина, укупног садржаја фенола, антиоксидативне и антибактеријске активности.

### 4.1.1. Хемијски састав етарског уља *S. montana*

Релативни удео (%) компоненти изолованих из етарског уља *S. montana* дати су у **Табели 4.1.** Идентификовано је 35 компоненти са укупним уделом од 98,15 %. Компоненте етарског уља су груписане у три групе: монотерпени, са две подгрупе, монотерпенски угљоводоници и оксидовани монотерпени; сесквитерпени и остала једињења.

Монотерпени су били заступљени у знатно већем уделу, чак 91,19 %, са укупно идентификованим бројем једињења 21, у поређењу са сесквитерпенима, који су били заступљени у врло малом уделу (5,98 %), и 13 идентификованих једињења, док су појединачна сесквитерпенска једињења била присутна у релативном уделу мањем од 2 %. Из групе осталих једињења, изоловано је само једињење 1-октен-3-ол, у релативном уделу од 0,99 %.

Монотерпенски угљоводоници су били заступљени са релативним уделом од 37,7 %, и укупно 10 детектованих једињења, међу којима су *p*-цимен, биолошки прекурсор карвакрола, са релативним уделом од 27,41 % и  $\gamma$ -терпинен са релативним уделом од 7,36 %, биле највише заступљени монотерпенски угљоводоници у етарском уљу *S. montana*.  $\alpha$ -терпинен је био заступљен у релативном уделу од 1,06 %, док су остали појединачни монотерпенски угљоводоници били заступљени у уделу мањем од 1 %.

Оксидовани монотерпени представљају најзаступљенију групу хемијских једињења са укупно идентификованих 11 једињења, и уделом заступљености од 53,49 %, међу којима се налази и најзаступљеније једињење у етарском уљу *S. montana*, карвакрол, који чини 47,69 % од укупно 35 идентификованих компоненти. Од осталих оксидованих монотерпена,

ендо-борнеол, линалол и паенол су били присутни у етарском уљу у релативном уделу око 1 %, док су остала појединачна једињења била присутна у уделу мањем од 1 %.

**Табела 4. 1.** Хемијски састав етарског уља *S. montana*

Компонента	Релативни удео, %
<b>МОНОТЕРПЕНИ (91,19)</b>	
<b>Монотерпенски угљоводоници (37,7)</b>	
<i>p</i> -Цимен	27,41
$\gamma$ -Терпинен	7,36
$\alpha$ -Терпинен	1,06
Лимонен	0,51
$\alpha$ -Пинен	0,45
$\beta$ -Мирцен	0,41
Камфен	0,23
$\alpha$ -Феландрен	0,11
Естрагол	0,09
$\alpha$ -Тујен	0,07
<b>Оксидовани монотерпени (53,49)</b>	
Карвакрол	47,69
ендо-Борнеол	1,47
Линалол	1,24
Паенол	1,14
Терпинен-4-ол	0,90
1,8-Цинеол	0,31
$\alpha$ -Терпинеол	0,20
DL-Ментол	0,17
Тимол	0,15
<i>p</i> -Цименол	0,14
Карвон	0,08
<b>СЕСКВИТЕРПЕНИ (5,98)</b>	
Кариофилен	1,82
$\beta$ -Бисаболен	1,07
Кариофилен оксид	0,95
$\delta$ -Кадинен	0,57
$\gamma$ -Муролен	0,34
$\gamma$ -Кадинен	0,27
Зингиберен	0,23
Копаен	0,18
$\beta$ -Боурбонене	0,13
$\alpha$ -Муролен	0,12

Спатуленол	0,11
$\alpha$ -Калакорен	0,10
$\alpha$ -Хумулен	0,09
<b>ОСТАЛА ЈЕДИЊЕЊА (0,99)</b>	
1-Октен-3-ол	0,99
Сума идентификованих (%)	98,15
Није идентификовано (%)	1,85

На основу приказаних резултата може се закључити да испитано етарско уље припада фенолном-карвакрол хемотипу (Vladić, 2017).

У многим истраживањима карвакрол (Ćavar *u cap.*, 2008; De Oliveira *u cap.*, 2011; Djenane *u cap.*, 2011; De Oliveira *u cap.*, 2012; Miladi *u cap.*, 2016; Benelli *u cap.*, 2017), *p*-цимен (De Oliveira *u cap.*, 2011; Djenane *u cap.*, 2011; De Oliveira *u cap.*, 2012; Miladi *u cap.*, 2016; Benelli *u cap.*, 2017) и  $\gamma$ -терпинен (Miladi *u cap.*, 2016; Benelli *u cap.*, 2017) биле су најзаступљеније компоненте у етарском уљу *Satureja montana* L, као и код етарских уља добијених из других врста рода *Satureja*, као што су *Satureja Khuzestanica* L. (Hasheminya *u cap.*, 2019), *Satureja mutica* L., *Satureja macrantha* L. и *Satureja intermedia* L. (Sefidkon *u Jamzad*, 2005), *Satureja subspicata* (Skočibušić *u cap.*, 2006).

Међутим, садржај ових појединачних компоненти код *Satureja* врста је варирао у широком опсегу, од 4,2 % (Bezbradica *u cap.*, 2005) до чак 80,55 % (Hasheminya *u cap.*, 2019) када је у питању садржај карвакрола. Односно, од 6,43 % (Hasheminya *u cap.*, 2019) до 41,4 % (Prieto *u cap.*, 2007) када је у питању садржај *p*-цимен, и од 1,7 % (Bezbradica *u cap.*, 2005) до 29,3 % (Sefidkon *u Jamzad*, 2005) када је у питању садржај  $\gamma$ -терпинена. Компонента која је, такође, на основу бројних литературних навода, идентификована у великом проценту у етарском уљу *S. montana* (од приближно 15 % до 30 %) је тимол, који, такође, припада групи оксидованих монотерпена као и карвакрол (Ćavar *u cap.*, 2008; De Oliveira *u cap.*, 2011; Djenane *u cap.*, 2011; De Oliveira *u cap.*, 2012; Benelli *u cap.*, 2017). Међутим, на основу добијених резултата у овом истраживању, релативни удео тимола у етарском уљу *S. montana* је био само 0,15 %.

Поређењем са другим литературним наводима, резултати су показала да хемијски састав етарског уља *S. montana*, као и других *Satureja* врста, може значајно да варира, и зависи понајвише од географског положаја, сезоне, сезонских варијација и спољашњих услова у којим је биљка гајена, сакупљена и сушена, начина брања, температуре, доступности воде, нутријената, атмосферских услова, као и од генетских карактеристика саме биљке, и технологије добијања етарског уља (Skočibušić *u cap.*, 2006; Ćavar *u cap.*, 2008; Djenane *u cap.*, 2011; De Oliveira *u cap.*, 2012; Miladi *u cap.*, 2016).

#### 4.1.2. Хемијски састав етарског уља *O. basilicum*

Релативни удео (%) компоненти изолованих из етарског уља *O. basilicum* представљен је у **Табели 4.2.** Идентификована је 51 компонента са укупним уделом од 88,64 %. Компоненте етарског уља су груписане у три групе: монотерпени, са две подгрупе, монотерпенски угљоводоници и оксидовани монотерпени; сесквитерпени и остала једињења.

**Табела 4. 2.** Хемијски састав етарског уља *O. basilicum*

Компонента	Релативни удео, %
<b>МОНОТЕРПЕНИ (59,31)</b>	
<b>Монотерпенски угљоводоници (1,29)</b>	
<i>α</i> -Тујен	0,74
<i>β</i> -Тујен	0,27
<i>p</i> -Цимен	0,15
Лимонен	0,13
<b>Оксидовани монотерпени (58,02)</b>	
<i>Линалол</i>	43,69
<i>Естрагол</i>	3,90
<i>β</i> -Малин	2,24
1,8-Цинеол	1,85
<i>Борнилацетат</i>	1,31
<i>Еугенол</i>	0,83
<i>Камфор</i>	0,76
<i>Гераниол</i>	0,68
<i>DL</i> -Ментол	0,60
<i>α</i> -Терпинеол	0,49
<i>Геранил ацетат</i>	0,40
<i>Терпинен-4-ол</i>	0,32
<i>Линалол оксид</i>	0,31
<i>ендо-Борнеол</i>	0,30
<i>Ментон</i>	0,21
<i>Метил-еугенол</i>	0,13
<b>СЕСКВИТЕРПЕНИ (25,69)</b>	
<i>γ</i> -Кадинен	4,11
<i>α</i> -Бергамотен	2,97
<i>β</i> -Елемен	2,23
<i>α</i> -Хумулен	2,14
<i>Хумулен епоксид</i>	1,66

<i>α</i> -Булнезен	1,40
Каларен	1,14
Спатуленол	1,06
<i>α</i> -Гвајен	1,04
<i>β</i> - Боурбонене	1,00
Кариофилен	0,99
Каламенен	0,92
Кариофилен оксид	0,92
<i>β</i> -Селинен	0,61
епи-Манол	0,45
НерOLIDол	0,44
Гермакрен	0,43
Копаен	0,43
Еудезма-3,11-диен	0,42
епи-Бициклосесквифеландрен	0,39
<i>β</i> -Еудесмол	0,33
<i>γ</i> -Муролен	0,25
<i>α</i> -Кубебен	0,19
Аромадендрене	0,17
<b>ОСТАЛА ЈЕДИЊЕЊА (3,64)</b>	
Глобулол	1,81
Хексадекан	0,43
Пентадекан	0,38
Хептадекан	0,35
Октадекан	0,31
Перхидроксифарнезил ацетон	0,24
Нонадекан	0,12
Сума идентификованих (%)	88,64
Није идентификовано (%)	11,36

Монотерпенска једињења су била заступљена у значајно вечем уделу (59,31 %) у односу на сесквитерпенска једињења (25,69 %), где су појединачне компоненте биле заступљене у уделу мањем од 5 %. Међутим, већи број идентификованих једињења припадао је групи сесквитерпена (24) у поређењу са монотерпенским једињењима (20).

Монотерпенски угљоводоници били су заступљени у мањем проценту, 1,29 %, док су оксидовани монотерпени били најзаступљенија група идентификованих једињења са уделом заступљености од 58,02 %, међу којима се налази и линалол, као најзаступљеније једињење у етарском уљу *O. basilicum*, са релативним уделом од 43,69 %. Од осталих детектованих оксидованих монотерпена, естрагол 3,9 %, *β*-малин 2,24 %, док је



појединачна заступљеност осталих компоненти била око 2 % или мање. Од сесквитерпена најзаступљенија једињења били су  $\gamma$ -кадинен са уделом од 4,11 % и  $\alpha$ -бергамотен са релативним уделом од 2,97 %, Остала једињења, била су присутна у значајно мањем уделу од 3,64 %.

Добијени резултати показују да етарско уље *O. basilicum* припада линалолском хемотипу (хемотип А) који је карактеристичан за Европско подручје (*Filip, 2014*). Према литературним подацима, Европски тип босиљка садржи етарско уље најбољег квалитета и ароме (*Simon u cap., 1990*).

*Filip u cap. (2014)* су такође у свом истраживању добили линалол као најзаступљеније једињење, са релативним уделом заступљености од 49,79 %, код етарског уља *O. basilicum*, узгајан на територији Републике Србије. *Jelačić u cap. (2011)* су анализирали хемијски састав етарских уља босиљка изолованих из биљака 10 различитих популација босиљка узгајаних на територији Републике Србије. Код свих 10 етарских уља најдоминантнија компонента је био линалол, а садржај је варирао од 51,52 % до 74,73 %.

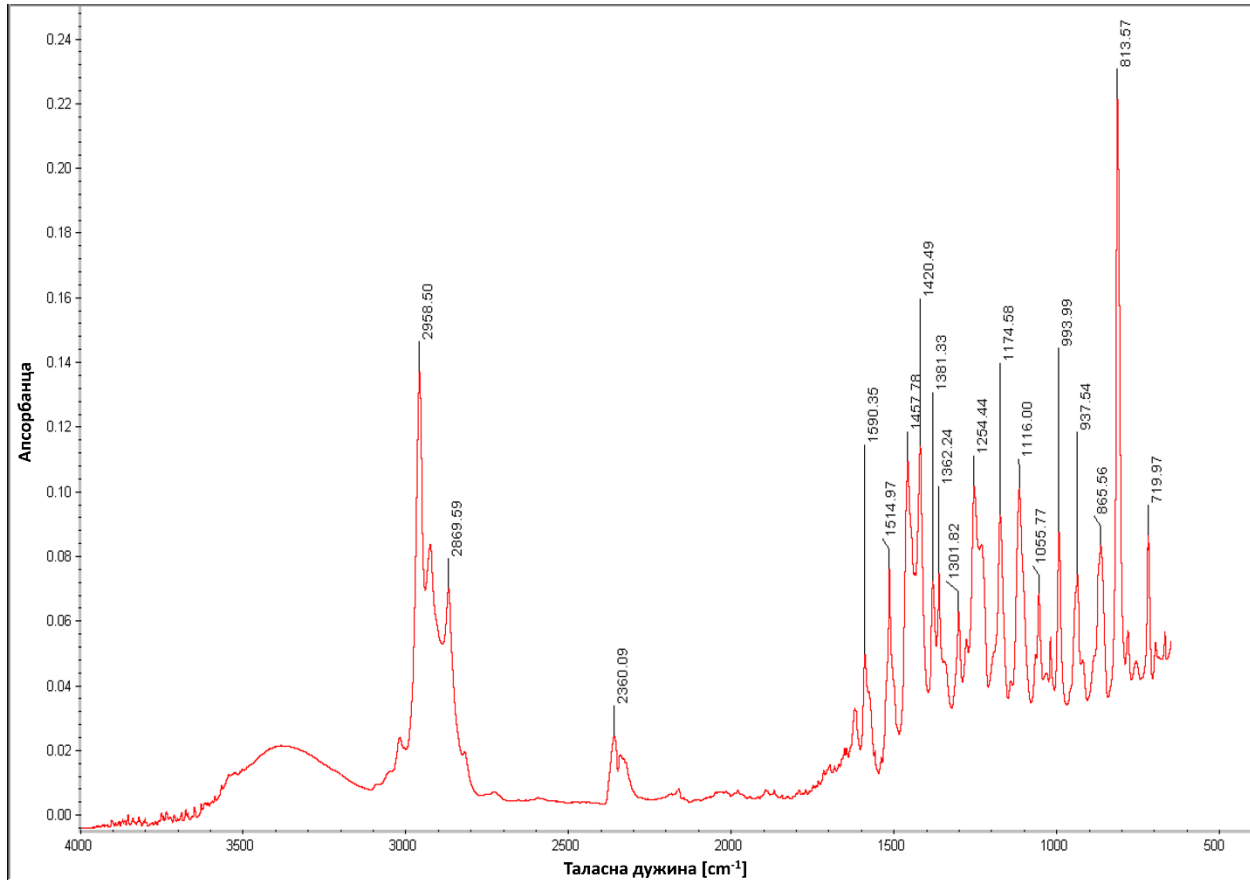
Када су у питању друге земље, *Sharafati-Chaleshtori u cap. (2015)* су у свом истраживању добили да је главна и најзаступљенија компонента у етарском уљу *O. basilicum*, са територије Ирана, био метил хавикол (естрагол), заступљен у релативном уделу од 85,19 %, а да је линалол био присутан само у релативном уделу од 1,03 %. *Pripdeevch u cap. (2010)* су идентификовали хемијски састав две сорте босиљка *O. basilicum* var. *thyriflora* и *O. basilicum*, обе узгајане на територији Тајланда, и добили да је најдоминантнија компонента код *O. basilicum* var. *thyriflora* био метил хавикол (естрагол), заступљен са уделом од 81,82 %, док су код етарског уља *O. basilicum* најдоминантије компоненте били линалол, заступљен са уделом од 43,78 %, и еугенол, заступљен са уделом од 13,66 %.

На основу прегледа литературе и добијених резултата, може се закључити да у хемијском саставу етарског уља *O. basilicum* изолованог из биљке која је гајена на територији Републике Србије, најзаступљенија компонента је углавном линалол. У поређењу са литературним наводима других земаља може се закључити, као и код етарског уља *S. montana*, да хемијски састав етарског уља *O. basilicum* зависи од многих фактора, а понајвише од географског положаја.

#### 4.1.3. Структурне особине етарског уља *S. montana*

FTIR спектар етарског уља *S. montana* са идентификованим карактеристичним пиковима, дат је на **Слици 4.1.**, док су FTIR спектри неких чистих компоненти, карвакрола,

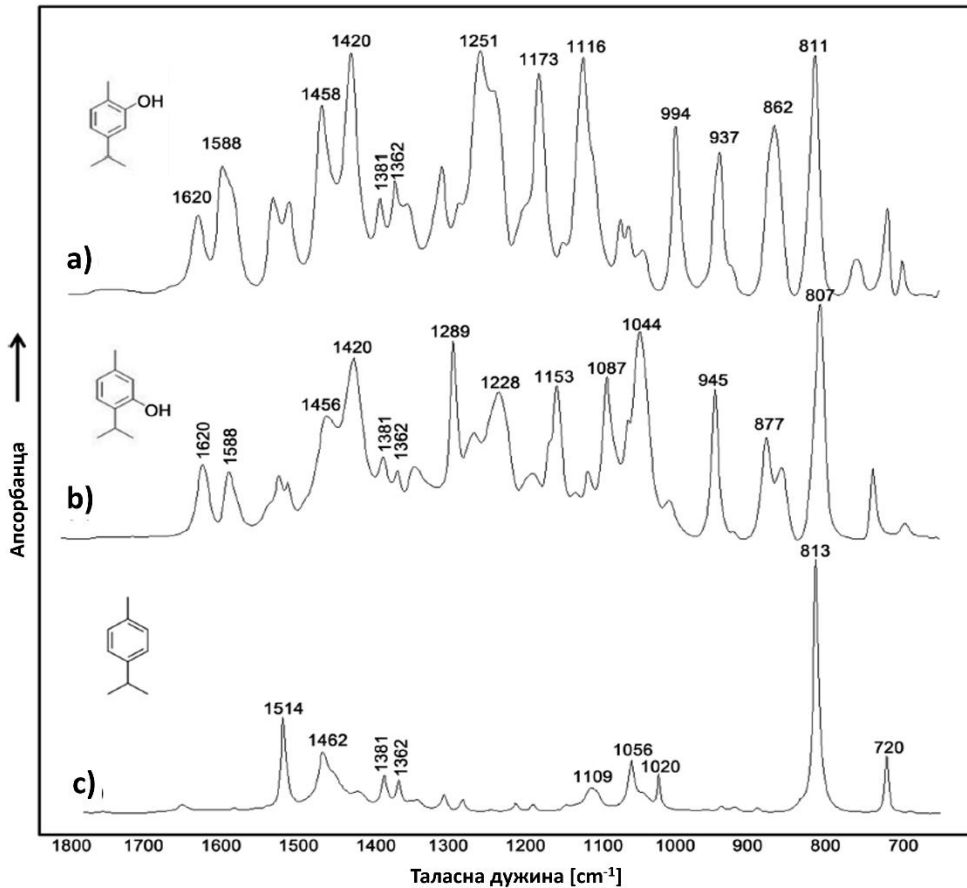
тимола и *p*-цимена, детектованих у испитиваном етарском уљу, међу којима су карвакрол и *p*-цимен компоненте са највећим релативним уделом (Поглавље 4.1.1.; Табела 4.1.), дати на **Слици 4.2.** (Valderrama и Rojas De, 2017). Ова једињења показују карактеристичне пикове на FTIR спектру који су индикатори одређених веза, и јављају се у спектралном опсегу од 800 до 2000  $\text{cm}^{-1}$ .



**Слика 4. 1.** FTIR спектар етарског уља *S. montana*

FTIR спектри карвакрола (**Слика 4.2.(a)**) и тимола (**Слика 4.2.(b)**) показују исте пикове у опсегу таласних дужина 1600 – 1585  $\text{cm}^{-1}$  карактеристичне за истезање C=C вибрација, као и пикове на 1381  $\text{cm}^{-1}$  и 1362  $\text{cm}^{-1}$  за изопропил-метил групу. Изомерна једињења као што су тимол и карвакрол показују и неке карактеристичне разлике у спектралном региону. У FTIR спектрима вибрације прстена код тимола се могу уочити на таласној дужини од 807  $\text{cm}^{-1}$ , док се за карвакрол овај одговарајући пик појављује на 811  $\text{cm}^{-1}$ . Карактеристични пикови карвакрола јављају се на таласним дужинама од 862, 837, 994, 1116 и 1173  $\text{cm}^{-1}$ , док карактеристични пикови за тимол налазе на таласним дужинама од 877, 945, 1044, 1087, 1153 и 1289  $\text{cm}^{-1}$ .

Поређењем са FTIR спектром етарског уља *S. montana* (**Слика 4.1.**) и добијеним карактеристичним пиковима, може се запазити да су пикови карактеристични за карвакрол били присутни и код спектра етарског уља *S. montana*, што је у сагласности са потврђеним великим релативним садржајем карвакрола у овом етарском уљу (47,69 %) (**Поглавље 4.1.1.; Табела 4.1.**), док су за тимол карактеристични пикови били присутни у знатно мањем проценту, што је највероватније последица његове слабе заступљености у овом испитиваном етарском уљу (0,15 %) (**Поглавље 4.1.1.; Табела 4.1.**).



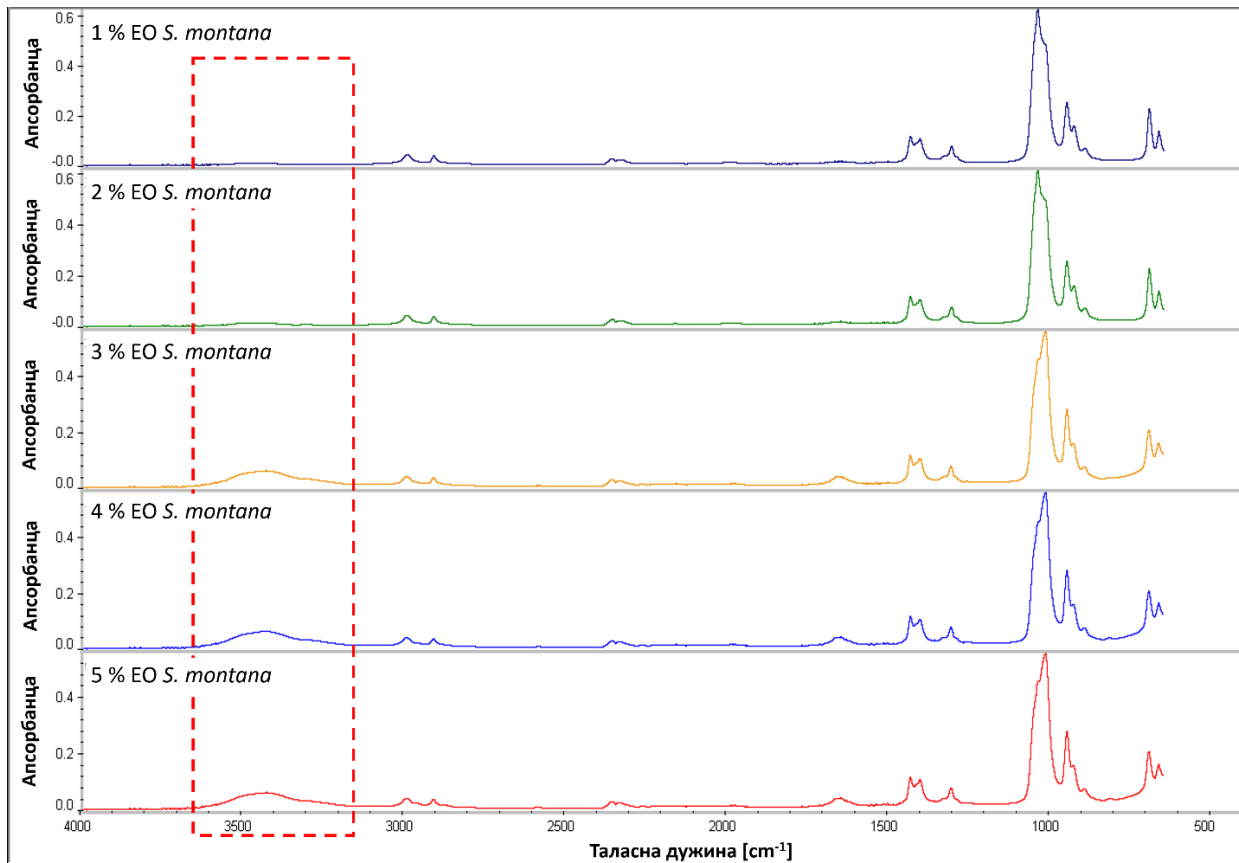
**Слика 4. 2.** FTIR спектри чистих компоненти: a) карвакрол, b) тимол и c) *p*-цимен (Valderrama и Rojas De, 2017)

FTIR спектар чистог једињења *p*-цимен (**Слика 4.2.(c)**) приказује вибрације истезања C=C везе ароматичног прстена у опсегу од 1500 до 1400  $\text{cm}^{-1}$ . Симетричне вибрације савијања изопропил-метил групе уочене су на таласној дужини 1381  $\text{cm}^{-1}$ , док се асиметричне вибрације ове групе појављују на таласној дужини од 1362  $\text{cm}^{-1}$ . Пара-супституисани фенил припада пиковима у опсегу од 1055  $\text{cm}^{-1}$  до 1019  $\text{cm}^{-1}$ , док јака двострука група фенилног језгра одговара пику на таласној дужини од 813  $\text{cm}^{-1}$ . Сви ови карактеристични пикови за *p*-цимен уочени су и код етарског уља *S. montana* (**Слика 4.1.**),

код ког је релативни удео овог једињења потврђен у великом проценту (27,41 %) (Поглавље 4.1.1.; Табела 4.1.).

Очигледно је да једињења присутна у нижој концентрацији у етарском уљу *S. montana*, као што је тимол, не утичу значајно на FTIR спектар, већ доминантни пикови одговарају његовим најзаступљенијим компонентама, карвакролу и *p*-цимену.

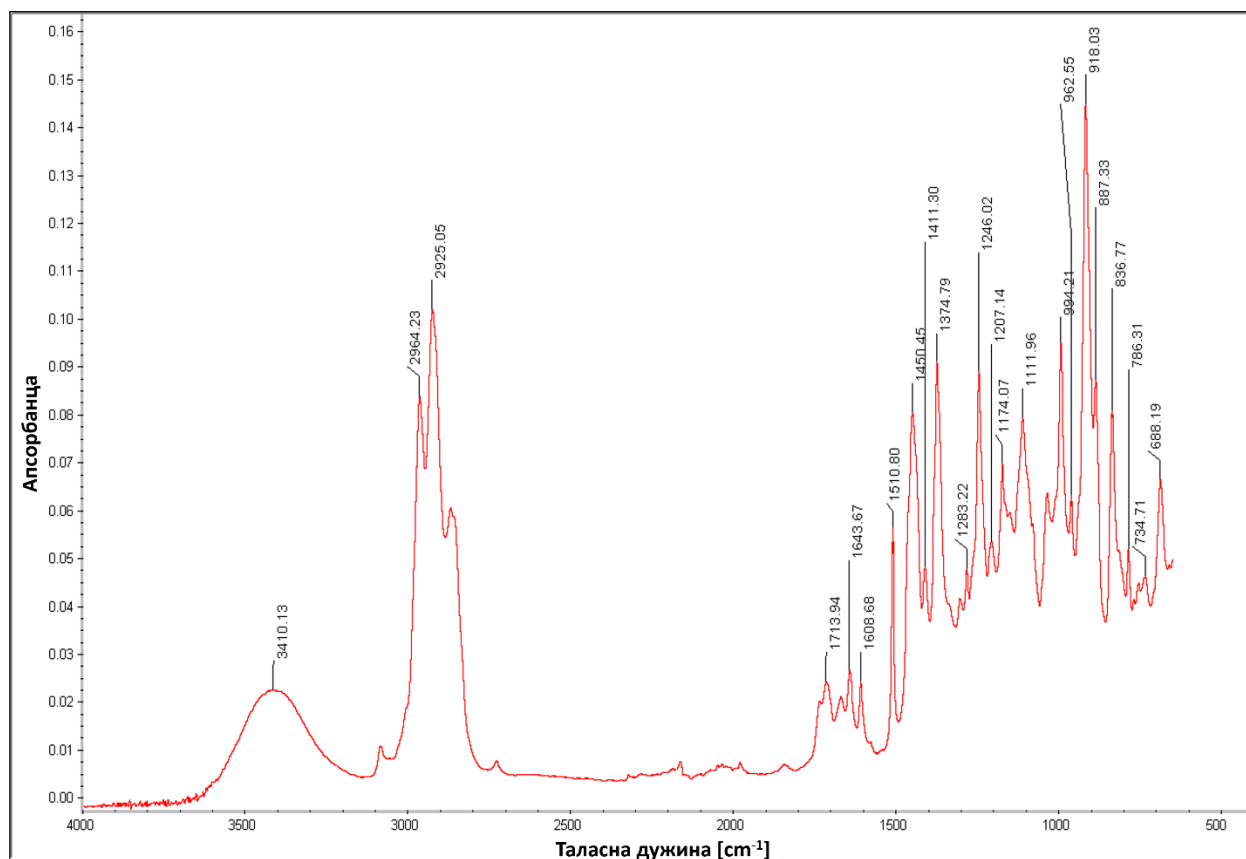
На **Слици 4.3.** дати су FTIR спектри етарског уља *S. montana* у различитим концентрацијама (1-5 % (v/v)), које су коришћене за добијање активних биополимерних материјала на бази PuOC. Највеће промене, са повећањем концентрације етарског уља, забележене су у спектралној регији таласних дужина 3700-3000  $\text{cm}^{-1}$ , где је са повећањем концентрације испитиваног етарског уља дошло до значајног повећања карактеристичних пикова ове регије. Највероватније да повећање пика у опсегу ових таласних дужина указује на повећање O-H група, карактеристичне за фенолна једињења присутна у етарским уљима (Ahmed *u cap.*, 2017).



**Слика 4. 3.** FTIR спектри етарског уља *S. montana* у различитим концентрацијама (1-5 % (v/v))

#### 4.1.4. Структурне особине етарског уља *O. basilicum*

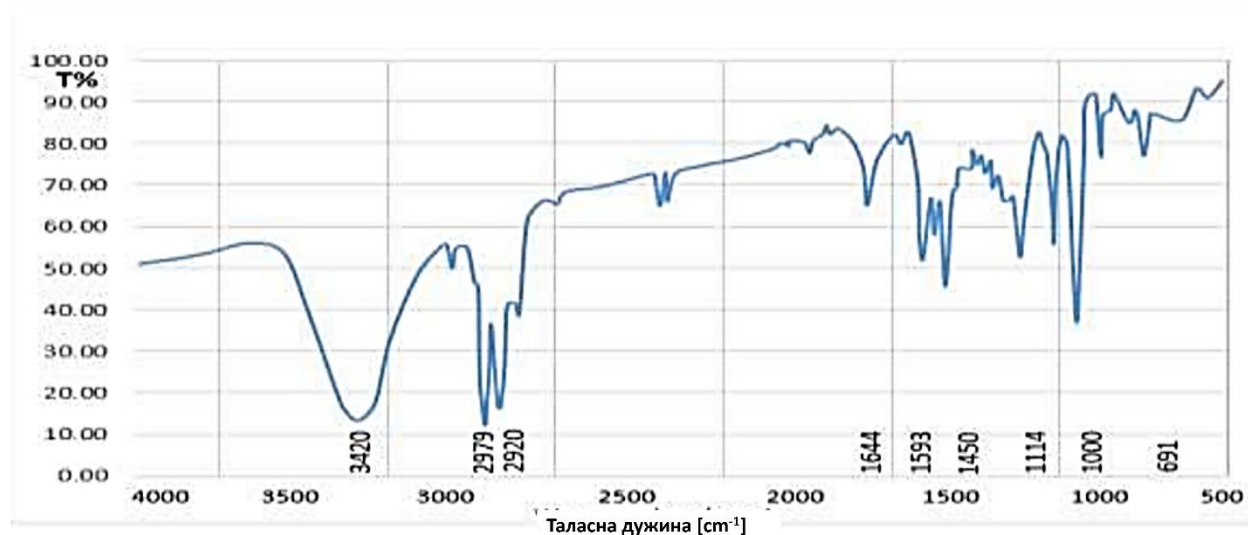
FTIR спектар етарског уља *O. basilicum* са идентификованим карактеристичним пиковима, дат је на **Слици 4.4.**, док је FTIR спектар чисте компоненте линалол, најзаступљеније једињење, са релативним уделом од 43,69 %, код етарског уља *O. basilicum* (**Поглавље 4.1.2.; Табела 4.2.**), дат на **Слици 4.5.** Спектар овог једињења показује карактеристичне пикове који су индикатори одређених веза. Ови карактеристични пикови јављају се у спектралном опсегу од 800 до 2000  $\text{cm}^{-1}$ .



**Слика 4. 4.** FTIR спектар етарског уља *O. basilicum*

На основу FTIR спектра чисте компоненте линалол (**Слика 4.5.**), линалол садржи (OH) групу на таласној дужини од  $3420 \text{ cm}^{-1}$ , C–H алифатске везе на таласним дужинама  $2979 \text{ cm}^{-1}$  и  $2920 \text{ cm}^{-1}$ . Таласна дужина на  $1644 \text{ cm}^{-1}$  одговара C=C групи. Таласна дужина од  $1593 \text{ cm}^{-1}$  одговара (N–H) групи, док таласна дужина на  $1450 \text{ cm}^{-1}$  одговара присуству (C–H) групе. Пик на  $1114 \text{ cm}^{-1}$  односи се на секундарну алкохолну групу (C–O), док се пик који је у вези са истезањем C–O групе може такође видети на таласној дужини  $1000 \text{ cm}^{-1}$ . Присуство (C–H) групе на таласној дужини  $691,09 \text{ cm}^{-1}$  односи се на присуство ароматичног једињења (*Jabir*

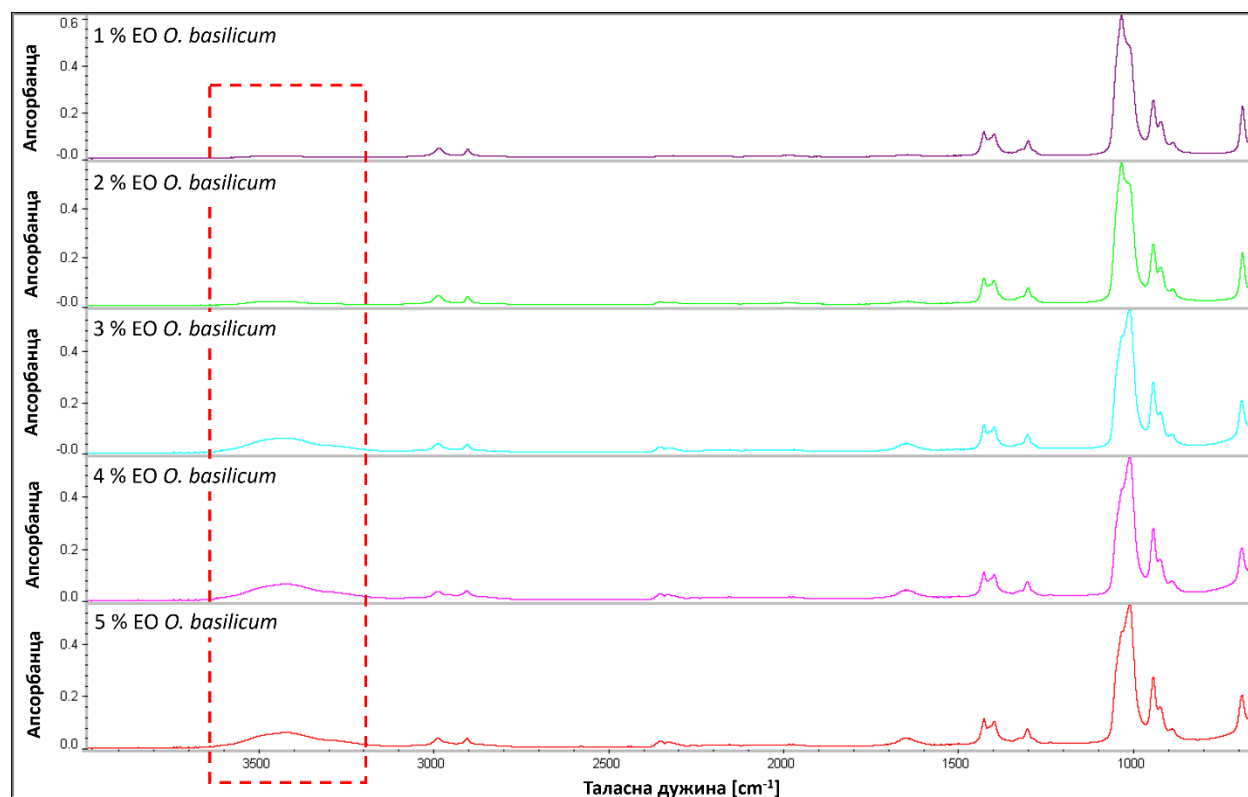
и сар., 2018). Ови карактеристични пикови могу се запазити на FTIR спектру етарског уља *O. basilicum* (Слика 4.4.), што потврђује присутност овог једињења, линалола, у испитиваном етарском уљу.



Слика 4. 5. FTIR спектар чисте компоненте линалол (Jabir и сар., 2018)

Према Ahmed и сар. (2017) апсорпциони пикови у спектралној области 3683-3583, 3053-2865, 1712, 1631-1610, 1511-1440, 1375-1331, 1225 и 1054-1014  $\text{cm}^{-1}$ , указују на присуство функционалних група: OH (фенолне и алкохолне), C–H (ароматичне и алифатске), C=O (естри), C=C (ароматичне и алифатске), карактеристике ароматичног прстена, изопропил и C–O (фенол, алкохол, етар и естар) група, редом, главних компоненти у етарском уљу *O. basilicum*. Вибрације савијања C–H везе ароматичног прстена се, такође, могу уочити у таласном опсегу на 840-727  $\text{cm}^{-1}$  (Ahmed и сар., 2017). Ови карактеристични пикови потврђени су и код етарског уља *O. basilicum* (Слика 4.4.).

На Слици 4.6. дати су FTIR спектри етарског уља *O. basilicum* у различитим концентрацијама (1-5 % (v/v)), коришћене за добијања активних биополимерних материјала. Као и код етарског уља *S. montana* (Слика 4.3.), највеће промене, са повећањем концентрације етарског уља, забележене су у спектралној регији таласних дужина 3700-3000  $\text{cm}^{-1}$ , где је са повећањем концентрације испитиваног етарског уља дошло до значајног повећања карактеристичних пикова ове регије. Према Ahmed и сар. (2017), ова спектрална област указује на присуство фенолних и алкохолних група етарских уља, што указује на повећање ових група са повећањем концентрације етарског уља.



Слика 4. 6. FTIR спектри етарског уља *O. basilicum* у различитим концентрацијама (1-5 % (v/v))

#### 4.1.5. Укупан садржај фенола у етарским уљима *S. montana* и *O. basilicum*

Обзиром да се фенолна једињења сматрају одговорним једињењима за активност етарских уља, одређивање укупног садржаја фенола (ТПС) у етарским уљима, најчешће се одређује у склопу испитивања његове антиоксидативне или антимицробне активности. Фенолна једињења могу да делују као редукујући агенси, хватача синглетног кисеоника, антиоксиданти доноси водоника и имају способност хелирања метала.

Укупан садржај фенола у етарским уљима *S. montana* и *O. basilicum*, одређен је у 5 различитих концентрација етанолних раствора етарских уља (1 % (v/v), 2 % (v/v), 3 % (v/v), 4 % (v/v), 5 % (v/v)). Ове концентрације су примењене за добијање активних амбалажних биополимерних материјала. Добијени резултати су приказани у **Табели 4.3.**

На основу добијених резултата запажа се да је етарско уље *S. montana* показало значајно већи садржај фенола у поређењу са етарским уљем *O. basilicum*, што ће се касније одразити и на њихову биолошку активности, као и на биолошку активност добијених биополимерних филмова.

Етарско уље *S. montana* већ у концентрацији од 1 %, имало је ТРС вредност 12,55 mg GK/mL, што је и до 9 пута веће од добијене ТРС вредности код 1 % етарског уља *O. basilicum* (1,46 mg GK/mL). Са повећањем концентрације, повећавају се и ТРС вредности, код оба испитивана етарска уља. Највећи садржај фенола запажен је код етарског уља *S. montana* у концентрацији од 4 % (17,27 mg GK/mL), док се код осталих концентрација, већих од 1 % (2 %, 3 % и 5 %) не запажа значајан утицај повећања концентрације етарског уља на добијене вредности ТРС ( $p > 0,05$ ). Слична ситуација запажа се и код етарског уља *O. basilicum*, где концентрације веће од 1 % етарског уља (2 – 5 %) нису имале значајан утицај на добијене ТРС вредности ( $p > 0,05$ ).

**Табела 4. 3.** Укупан садржај фенола у етарским уљима *S. montana* и *O. basilicum*

ЕО, % (v/v)	Укупан садржај фенола, mg GK/mL	
	етарско уље <i>S. montana</i>	етарско уље <i>O. basilicum</i>
1	12,55 ± 0,82 <sup>d</sup>	1,46 ± 0,04 <sup>a</sup>
2	15,91 ± 0,49 <sup>e</sup>	2,75 ± 0,04 <sup>b</sup>
3	15,59 ± 0,63 <sup>e</sup>	3,97 ± 0,51 <sup>c</sup>
4	17,27 ± 1,23 <sup>f</sup>	3,73 ± 0,41 <sup>bc</sup>
5	15,87 ± 0,16 <sup>e</sup>	3,82 ± 0,18 <sup>bc</sup>

\* Различита слова указују на значајне разлике међу узорцима у колонама ( $p < 0,05$ )

*Valizadeh u cap. (2014)* и *Oke u cap. (2009)* су испитивали садржај укупних фенола у 1 mL етарског уља *Satureja hortensis*, односно 0,1 mL етарског уља *Satureja cuneifolia* Ten., редом. Добијени резултати ТРС вредности износили су 32,65 mg/g код *Satureja hortensis*, и 1,85 mg/g код *Satureja cuneifolia* Ten. етарског уља. На основу прегледа литературе, врло мало истраживања се бавило одређивањем ТРС вредности етарских уља *Satureja* врста, много више података су били у вези са метанолним екстрактима *Satureja* врста, који су у поређењу са етарским уљима садржили значајно веће вредности ТРС. Разлог овоме се приписује управо примени метанола као растварача за екстракцију фенолних компоненти, који у односу на остале органске раствараче је показао најбољу ефикасност (*Čavar-Zeljковић u cap., 2015*).

Када су у питању ТРС вредности етарског уља *O. basilicum*, значајно веће вредности су добили *Sharafati-Chaleshtori u cap. (2015)*, код којих је ТРС вредност етарског уља *O. basilicum* износила 18,1 mg GK/g, без датих података о испитиваној концентрацији етарског уља. Међутим, већи или слични резултати ТРС вредности етарског уља *O. basilicum*, су добијени поређењем са резултатима датим код *Al-Maskri u cap. (2011)*, који су испитивали ТРС вредности у 100 µL етарског уља *O. basilicum* изолованих из биљака *Ocimum basilicum* L. гајених током различитих годишњих доба, и добили да је највећи садржај укупних фенола забележен код етарског уља *O. basilicum* из периода пролећа и износио је 1,76 mg GK/mL,



док је ТРС у етарском уљу *O. basilicum* из летњег и зимског периода износио 0,70 mg GK/mL, односно 0,51 mg GK/mL, редом.

#### 4.1.6. Антиоксидативна активност етарских уља *S. montana* и *O. basilicum*

Антиоксидативна активност екстракта и етарског уља *S. montana* дата је у многим литературним подацима (*Prieto u cap., 2007; Ćavar u cap., 2008; Serrano u cap., 2010; Ćavar u cap., 2013*). Фенолне компоненте присутне у етарским уљима, највише су одговорне за њихову активност. На основу добијених ТРС вредности етарског уља *S. montana* (**Поглавље 4.1.5.; Табела 4.3.**), етарско уље је имало висок садржај фенолних компоненти, а антиоксидативна активност фенолног једињења карвакрол, које је забележено као најдоминантније једињење у етарском уљу (**Поглавље 4.1.1.; Табела 4.1.**), потврђена у многобројним истраживањима. Антиоксидативни потенцијал карвакрола често се приписује присуству хидроксилне групе повезане са ароматичним прстеном. Истраживања су показала да је карвакрол врло ефикасан хватач слободних радикала, укључујући DPPH радикал, пероксил радикал, супероксид радикал, хидроген пероксид и азотне оксиде (*Aeschbach u cap., 1994; Yanishlieva u cap., 1999; Prieto u cap., 2007*).

Истраживања су такође потврдила и јака антиоксидативна деловања етарског уља *O. basilicum* (*Kelm u cap., 2000; Yun u cap., 2003; Leal u cap., 2006; Leal u cap., 2008; Pripdeevch u cap., 2010*), које се такође приписује фенолним компонентама, где су ТРС вредности етарског уља *O. basilicum* била значајно нижа у поређењу са ТРС вредностима етарског уља *S. montana* (**Поглавље 4.1.5.; Табела 4.3.**).

Антиоксидативна активност етарских уља *S. montana* и *O. basilicum* дата је у **Табели 4.4.**

На основу добијених резултата запажа се да је етарско уље *S. montana* показало изузетну способност неутрализације DPPH радикала, независно од примењене концентрације (1 – 5 % (v/v)). Већ приликом испитивања етарског уља у концентрацији од 1 % неутрализовано је 76,32 % DPPH радикала, док је повећање концентрације на 2 % повећало и антиоксидативну активност испитиваног уља, и неутрализовано око 91 % DPPH радикала. Повећање концентрације на 3, 4 и 5 %, није показало значајан утицај на способност неутрализације DPPH радикала етарског уље *S. montana* ( $p > 0,05$ ). Када је у питању способност неутрализације DPPH радикала етарског уља *O. basilicum*, запажена је знатно слабија активност испитиваног етарског уља у концентрацији од 1 % (46,37 %) и 2 % (77,22 %), у поређењу са етарским уљем *S. montana*, док су више концентрације (3-5 %) биле упоредиве са вредностима добијеним код етарског уља *S. montana* ( $p > 0,05$ ).

Табела 4. 4. Антиоксидативна активност етарских уља *S. montana* и *O. basilicum*

ЕО, % (v/v)	Способност	Способност	Редукциона моћ
	неутрализације DPPH радикала, %	неутрализације ОН радикала, %	
<b>етарско уље <i>S. montana</i></b>			
1	76,32 ± 0,51 <sup>b</sup>	46.20 ± 2.74	0,94 ± 0,00 <sup>d</sup>
2	90,76 ± 0,00 <sup>de</sup>	35,08 ± 7,05	1,19 ± 0,09 <sup>e</sup>
3	91,85 ± 1,29 <sup>e</sup>	36.02 ± 8.06	ВО
4	91,86 ± 0,51 <sup>e</sup>	34.60 ± 6.40	ВО
5	91,84 ± 0,31 <sup>e</sup>	41.47 ± 1.66	ВО
<b>етарско уље <i>O. basilicum</i></b>			
1	46,37 ± 0,33 <sup>a</sup>	НВ	0,22 ± 0,04 <sup>a</sup>
2	77,22 ± 1,19 <sup>bc</sup>	НВ	0,37 ± 0,01 <sup>ab</sup>
3	88,14 ± 0,24 <sup>cd</sup>	НВ	0,44 ± 0,03 <sup>b</sup>
4	90,51 ± 1,05 <sup>de</sup>	НВ	0,51 ± 0,02 <sup>bc</sup>
5	91,94 ± 1,00 <sup>e</sup>	НВ	0,59 ± 0,00 <sup>c</sup>

\* НВ – негативна вредност; ВО - ван опсега;

\* Различита слова указују на значајне разлике међу узорцима у колонама (p<0,05)

На основу добијених резултата, запажа се слабија способност неутрализације ОН радикала етарског уља *S. montana* у поређењу са вредностима добијеним код неутрализације DPPH радикала, чак и до 60 %, без неког значајнијег утицаја испитиване концентрације етарског уља на активност (p>0,05). Када је у питању способност неутрализације ОН радикала етарског уља *O. basilicum*, добијене су негативне вредности за све испитиване концентрације (1-5 % (v/v)). Ови резултати указују на могућност про-оксидативног деловања испитиваног етарског уља. Про-оксидативни ефекат различитих фенолних компоненти, као што је линалол, најзаступљенија компонента у етарском уљу *O. basilicum*, је већ забележен у литератури (Ohshima и сар., 1998; Ruberto и Baratta, 2000; Santos и сар., 2004). Такође, на основу литературних података, није неубичајено да фенолне компоненте показују антиоксидативни и про-оксидативни ефекат, најчешће у зависности од примењене дозе и концентрације (Llana-Ruiz-Cabello и сар., 2015).

На основу добијених резултата за редукциону моћ етарских уља, запажа се да етарско уље *S. montana* показује већу активност у поређењу са етарским уљем *O. basilicum*, чак и до 77 %, када се посматра најнижа концентрација (1 %), односно 69 %, када се посматра концентрација од 2 % испитиваних етарских уља. Етарско уље *S. montana* у концентрацијама од 3, 4 и 5 % имало је вредности апсорбанци које су биле ван опсега мерења, док се код етарског уља *O. basilicum* уочава пораст редукционе моћи са порастом концентрације етарског уља (p>0,05).

#### 4.1.7. Антибактеријска активност етарских уља *S. montana* и *O. basilicum*

*Ponce и сар. (2003)* су дали класификацију осетљивости бактерије према испитиваним активним једињењима, а у зависности од добијеног пречника зоне инхибиције:

- за пречнике мање и једнако 8 mm – бактерија није осетљива;
- за пречнике од 9 mm до 14 mm – бактерија је осетљива;
- за пречнике од 15 mm до 19 mm – бактерија је веома осетљива;
- за пречнике веће од 20 mm – бактерија је изузетно осетљива.

У **Табели 4.5.** дате су антибактеријске активности етарских уља *S. montana* и *O. basilicum*, у различитим концентрацијама (1 – 5 % (v/v)), према две грам-негативне бактерије *E. coli* и *S. Enteritidis*, и према три грам-позитивне бактерије *L. monocytogenes*, *S. aureus* и *B. cereus*, на основу добијених пречника зоне инхибиције.

**Табела 4. 5.** Антибактеријска активност етарских уља *S. montana* и *O. basilicum*

ЕО, % (v/v)	Зона инхибиције, mm				
	<i>E. coli</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>
<b>етарско уље <i>S. montana</i></b>					
1	H3	H3	H3	H3	H3
2	H3	H3	H3	H3	H3
3	9,5 ± 0,5 <sup>bBC</sup>	10,5 ± 0,5 <sup>bB</sup>	H3	10,0 ± 0,0 <sup>bC</sup>	14,5 ± 0,5 <sup>aB</sup>
4	10,0 ± 0,0 <sup>abC</sup>	10,5 ± 0,5 <sup>bB</sup>	9,0 ± 0,0 <sup>aA</sup>	9,5 ± 0,5 <sup>abC</sup>	14,0 ± 1,0 <sup>cB</sup>
5	9,5 ± 0,5 <sup>aBC</sup>	13,0 ± 0,0 <sup>cC</sup>	10,0 ± 0,0 <sup>aB</sup>	11,5 ± 0,5 <sup>bD</sup>	23,0 ± 0,0 <sup>dC</sup>
<b>етарско уље <i>O. basilicum</i></b>					
1	H3	H3	H3	H3	H3
2	H3	H3	H3	H3	H3
3	8,0 ± 0,0 <sup>abA</sup>	9,0 ± 0,0 <sup>bA</sup>	H3	7,0 ± 0,0 <sup>aA</sup>	8,0 ± 1,0 <sup>abA</sup>
4	8,5 ± 0,5 <sup>aAB</sup>	8,5 ± 0,5 <sup>aA</sup>	H3	7,5 ± 0,5 <sup>aAB</sup>	8,5 ± 0,5 <sup>aA</sup>
5	8,5 ± 0,5 <sup>abAB</sup>	9,0 ± 0,0 <sup>bA</sup>	H3	8,0 ± 0,0 <sup>aB</sup>	8,0 ± 0,0 <sup>aA</sup>

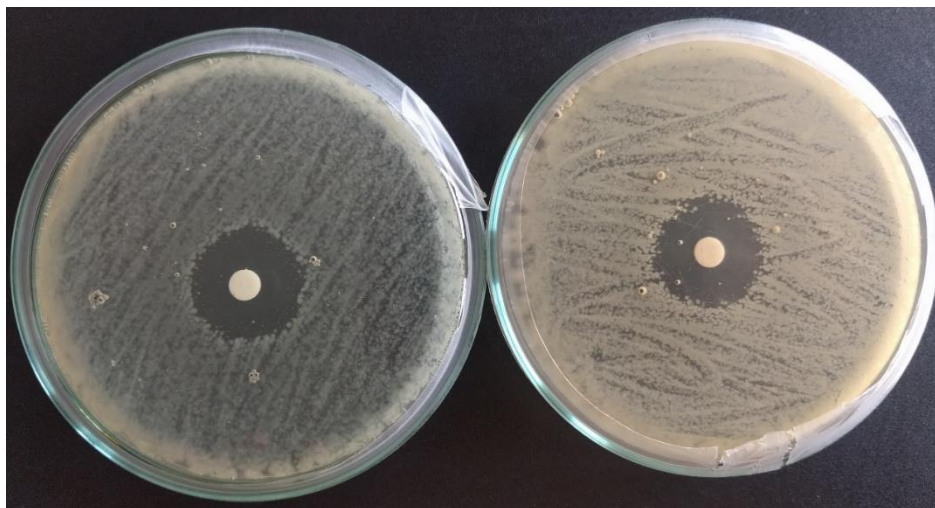
\* H3 – нема зоне;

\* Различита мала слова указују на значајне разлике међу узорцима у редовима, док различита велика слова указују на значајне разлике међу узорцима у колонама (p<0,05)

На основу добијених резултата, етарска уља нису показала антибактеријску активност ни према једној испитиваној бактерији у концентрацијама од 1 % и 2 %.

Етарско уље *S. montana* показало је антибактеријску активност према свих пет испитаних бактерија у концентрацијама већим од 3 %. На основу добијених резултата, запажа се да је најосетљивија бактерија била *B. cereus*, при испитивању етарског уља у концентрацији од 5 %, где је добијени пречник зоне инхибиције био 23 mm (**Слика 4.7.**).

Најмање осетљива бактерија на етарско уље *S. montana* била је *L. monocytogenes*, где је постигнута слаба активност етарског уља тек при коцентрацији од 4 %. Антибактеријска активност етарског уље *S. montana* према различитим *Staphylococcus* spp., као и према *L. monocytogenes* је забележена у литератури (*Chorianopoulos u cap., 2004; Ćavar u cap., 2008; Dal Pozzo u cap., 2011; Sienkiewicz u cap., 2012; Fratini u cap., 2014*). Такође, *Fratini u cap. (2014)* су у свом истраживању добили да је етарско уље *S. montana* било једино од 10 испитиваних комерцијалних етарских уља које је дало зону инхибиције према бактерији *E. coli*.



**Слика 4. 7.** Пречник зоне инхибиције етарског уља *S. montana* у концентрацији од 5 % према *B. cereus*

Истраживања су такође потврдила антимикуробну активност карвакрола, основне и најзаступљеније компоненте етарског уље *S. montana* (**Поглавље 4.1.1.; Табела 4.1.**), према различитим бактеријама, као што су *E. coli*, *L. monocytogenes* и *S. Typhimurium* (*Demetzos u cap., 2002; Rhayour u cap., 2003; Yamazaki u cap., 2004; Oussalah u Laroix, 2006; Moosavy u cap., 2008; Rivas u cap., 2010; Ruiz-Navajas u cap., 2013; Dashipour u cap., 2015*). Претпоставља се да су главни разлози за високу антимикуробну активност карвакрола његова хидрофобност и присуство слободне хидроксилне групе (*Ben Arfa u cap., 2006*).

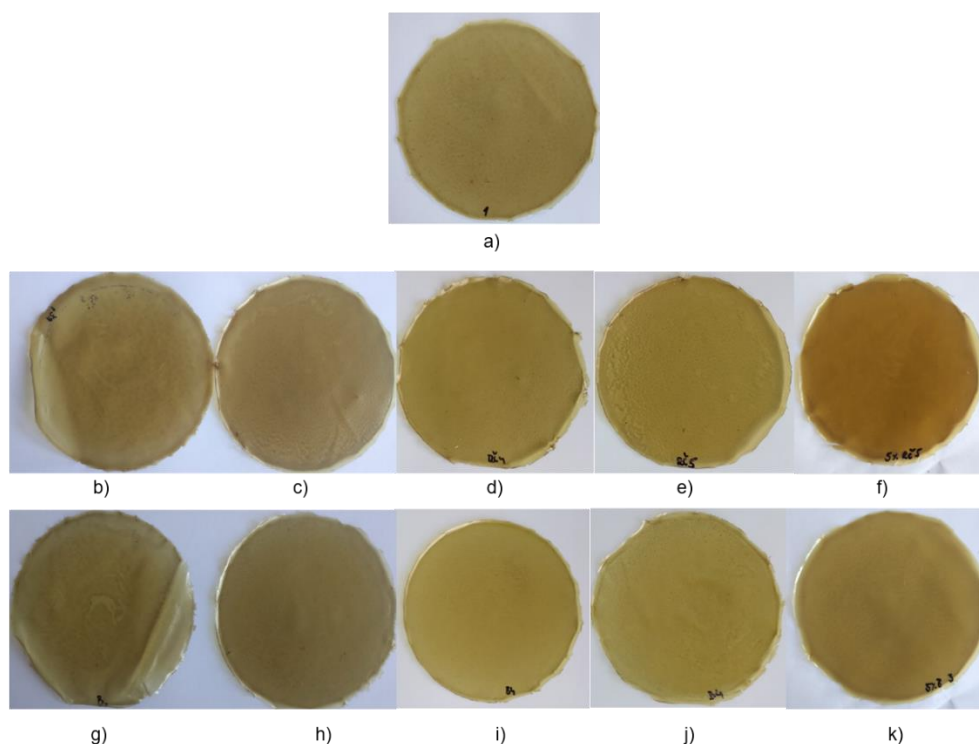
Са повећањем концентрације, етарско уље *O. basilicum* показало је неку антибактеријску активност али врло слабу, независно од концентрације етарског уља ( $p > 0,05$ ). До појаве зоне инхибиције није дошло у случају испитивања антибактеријске активности према *L. monocytogenes*, независно од концентрације етарског уља, док су

остале бактерије показале врло слабу осетљивост према етарском уљу *O. basilicum*, а добијене зоне инхибиције кретале су се од 7 mm, код испитивања активности 3 % етарског уља *O. basilicum* према *S. aureus*, до 9 mm, код испитивања активности 3 % и 5 % етарског уља *O. basilicum* према *S. Enteritidis*. Антибактеријска активност етарског уља *O. basilicum* према различитим бактеријама је забележена у литератури (*Bozin u cap., 2006; Hussain u cap., 2008*), која се приписује најчешће линалолу као основној и врло често најзаступљенијом компонентом етарског уља *O. basilicum*. Међутим, етарско уље *O. basilicum*, упркос високом садржају линалола (**Поглавље 4.1.2.; Табела 4.2.**), показало је слабу антибактеријску активност према свих 5 испитиваних бактерија. Разлог може бити већи садржај осталих појединачних компоненти у етарском уљу *O. basilicum* забележених у истраживањима, као што је метил хавикол (естрагол) (*Bozin u cap., 2006*), или епи- $\alpha$ -кадинол и  $\alpha$ -бергамотен (*Hussain u cap., 2008*), што би могло допринети већој активности услед синергистичког ефекта ових компоненти. Међутим, релативни удео ових појединачних компоненти у етарском уљу *O. basilicum* коришћеном у овом истраживању био је мањи од 5 % (**Поглавље 4.1.2.; Табела 4.2.**).

Етарска уља, слична другим липофилним једињењима, поседују висок афинитет према ћелијским мембранама. Сматра се да је механизам антимицробне активности етарских уља повезан са њиховом способношћу да продиру у ћелијски зид бактерије и нападају фосфолипидну двослојну ћелијску мембрану (*Arfat u cap., 2014*). Фенолна једињења могу да дезинтегришу спољашњу мембрану грам-негативних бактерија и тако повећају пропусност цитоплазматске мембране (*Burt, 2004; Shojaee-Aliabadi u cap., 2013*). Према *Burt (2004)* карвакрол формира канале кроз бактеријску мембрану потискивањем ланаца масних киселина фосфолипида, омогућавајући јонима да напусте цитоплазму и тако повећавајући пропустљивост цитоплазмине мембране за АТП, доводећи до смрти ћелије.

## 4.2. Карактеризација активних биополимерних филмова на бази погаче уљане тикве голице и етарског уља *S. montana* или *O. basilicum*

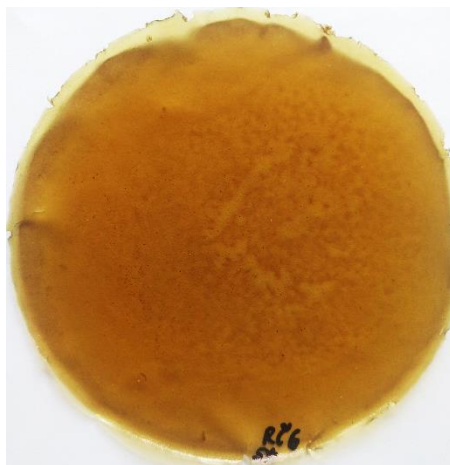
Карактеризација активних биополимерних филмова на бази  $PuOC$  и етарског уља *S. montana* или *O. basilicum*, у различитим концентрацијама (1 – 5 % (v/v)), испитана је одређивањем физичко-механичких, физичко-хемијских, баријерних, структурних особина, укупног садржаја фенола, антиоксидативне и антибактеријске активности добијених филмова. Експериментални модел добијања испитиваних активних филмова дат је у Поглављу 3.5.2.; Табела 3.2., а добијени активни филмови на бази  $PuOC$  су приказани на Слици 4.8..



**Слика 4. 8.** Активни биополимерни филмова на бази  $PuOC$ : а) контрола, b), c), d), e), f) са етарским уљем *S. montana* у концентрацијама од 1, 2, 3, 4, 5 % (v/v), редом; g), h), i), j), k) са етарским уљем *O. basilicum* у концентрацијама од 1, 2, 3, 4, 5 % (v/v), редом

Сви филмови су били зеленкасте боје, која потиче од супстрата ( $PuOC$ ), мутни и флексибилни. Запажена је значајна разлика у дебљини активних филмова, где се са повећањем додате концентрације етарског уља, повећала и дебљина биополимерних филмова. Присуство жућкасте нијансе запажено је код активних филмова са додатком

етарских уља, посебно код филмова са етарским уљем *S. montana*, која је била интензивнија са повећањем концентрације додатог етарског уља. Контролни филм, је имао благи мирис на супстрат, док су филмови са додатком етарских уља имали изражен мирис на уље, који је био интензивнији са повећањем концентрације. Код филмова са већом концентрацијом етарских уља, запажене су неравнине на површинама услед нехомогене распоређености и недовољне емулзификације уља у филмогеној суспензији (**Слика 4.9**).



**Слика 4. 9.** Активни биополимерни филм на бази *PuOC* са етарским уљем *S. montana* у концентрацији од 5 %

Највероватније да је до појаве нехомогене структуре и хрпавости површине филма дошло услед агрегације и коалесценције капљица уља током сушења (*Sánchez-González u cap., 2010; Abdollahi u cap., 2019*). Ова појава може значајно утицати на механичке особине биополимерних филмова. Међутим, ни на једном узорку није дошло до формирања пукотина или пора на површини.

#### 4.2.1. Физичко-механичке особине

**Дебљина активних филмова** на бази *PuOC* са различитим концентрацијама (1-5 % (v/v)) етарског уља *S. montana* или *O. basilicum*, дата је у **Табели 4.6.** Дебљина контролног филма била је 125,66  $\mu\text{m}$ , док је додаток етарских уља довео до пораста дебљине добијених филмова. Са повећањем концентрације етарских уља, расла је и дебљина филмова.

Дебљине активних филмова на бази *PuOC* са додатком етарског уља *S. montana* кретале су се од 125,62  $\mu\text{m}$  (за филм са 1 % етарског уља) до 172,04  $\mu\text{m}$  (за филм са 5 %

етарског уља), где је додаток етарског уља у концентрацији од 5 % повећао дебљину контролног филма за 37 %.

Дебљине активних филмова на бази  $PuOC$  са додатком етарског уља *O. basilicum* кретале су се од 135,41  $\mu m$  (за филм са 1 % етарског уља) до 195,12  $\mu m$  (за филм са 5 % етарског уља). Запажено је још веће повећање дебљине контролног филма са додатком етарског уља *O. basilicum* у концентрацији од 5 %, у поређењу са додатком етарског уља *S. montana*.

Многобројна истраживања су добила повећање дебљине биополимерних филмова са додатком етарских уља, и са повећањем њихове концентрације (*Ahmad u cap., 2012; Aliheidar u cap., 2013; Jouki u cap., 2014; Dashipour u cap., 2015; Hasheminya u cap., 2019;*), указујући на то да дебљина биополимерних филмова расте са порастом броја растворених компоненти, што се приписује повећању садржаја чврсте супстанце.

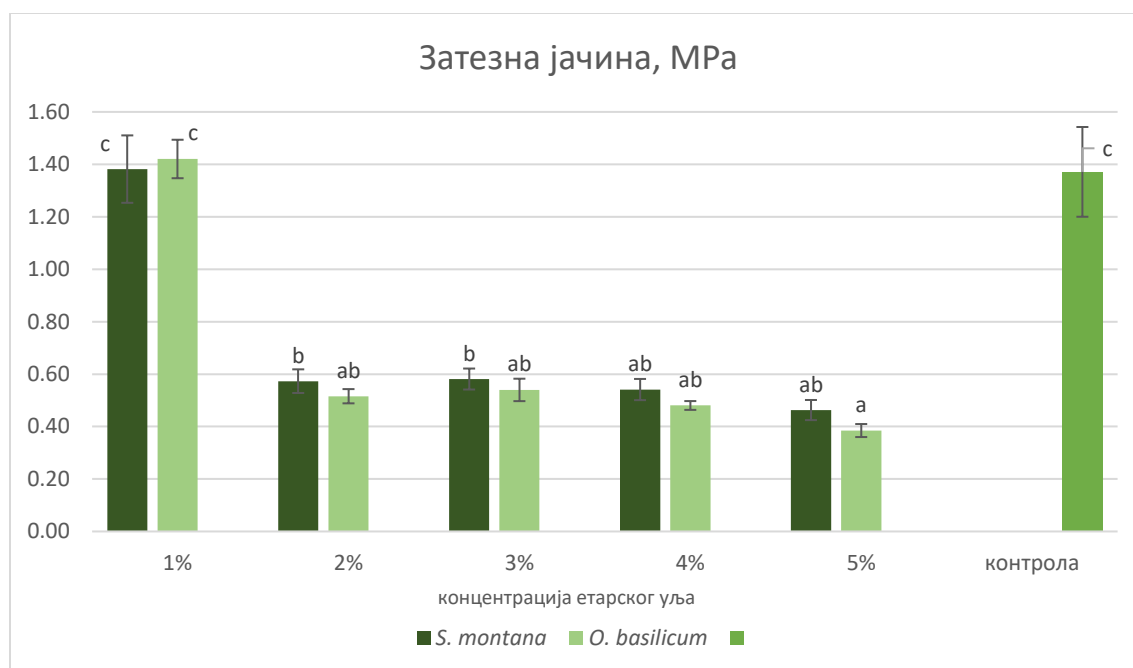
**Табела 4. 6.** Дебљине активних биополимерних филмова на бази  $PuOC$  и етарског уља *S. montana* или *O. basilicum*

Дебљина филма, $\mu m$		
контрола	125,66 $\pm$ 3,25 <sup>a</sup>	
ЕО, % (v/v)	етарско уље <i>S. montana</i>	етарско уље <i>O. basilicum</i>
1	125,62 $\pm$ 1,81 <sup>a</sup>	135,41 $\pm$ 5,28 <sup>b</sup>
2	158,52 $\pm$ 2,97 <sup>c</sup>	156,55 $\pm$ 5,61 <sup>c</sup>
3	163,66 $\pm$ 1,55 <sup>cd</sup>	161,51 $\pm$ 5,08 <sup>cd</sup>
4	160,00 $\pm$ 1,40 <sup>c</sup>	168,06 $\pm$ 4,77 <sup>de</sup>
5	172,04 $\pm$ 3,60 <sup>e</sup>	195,12 $\pm$ 6,12 <sup>f</sup>

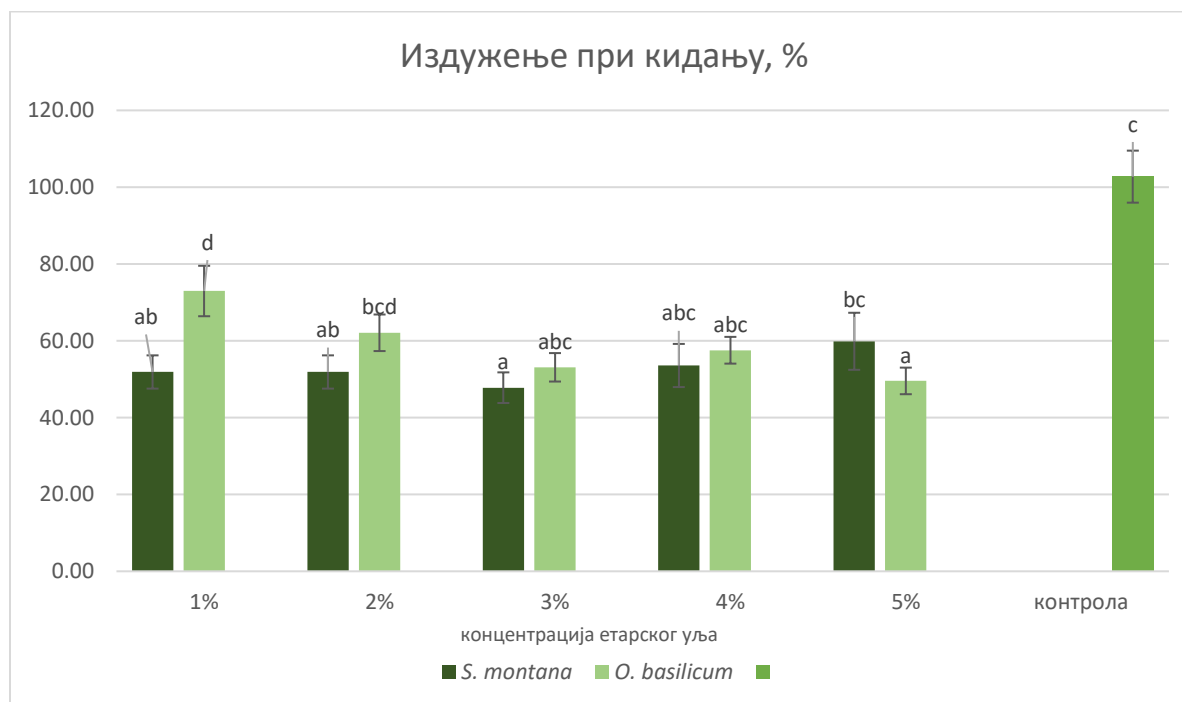
\* Различита слова указују на значајне разлике међу узорцима у колонама ( $p < 0,05$ )

**Затезна јачина (TS) и издужење при кидању (EAB)** активних биополимерних филмова на бази  $PuOC$  са различитим концентрацијама (1-5 % (v/v)) етарског уља *S. montana* или *O. basilicum*, дате су на **Слици 4.10.** и **Слици 4.11.**, редом. Контролни филм је имао TS вредност 1,37 МПа и EAB вредност 102,74 %. Поређењем са осталим биополимерним филмовима, филм на бази  $PuOC$  показује доста ниске TS вредности, али оптималне EAB вредности. Уопштено је показано да полисахаридни биополимерни филмови, показују нешто веће TS вредности у поређењу са протеинским биополимерним филмовима.





**Слика 4. 10.** Затезна јачина активних биополимерних филмова на бази РиОС и етарског уља *S. montana* или *O. basilicum*. Различита слова указују на значајне разлике међу узорцима ( $p < 0,05$ ).



**Слика 4. 11.** Издужење при кидању активних биополимерних филмова на бази РиОС и етарског уља *S. montana* или *O. basilicum*. Различита слова указују на значајне разлике међу узорцима ( $p < 0,05$ ).

Вредности TS биополимерних филмова на бази хитозана, у различитим литературама, су се кретале од око 10 МПа (*Hosseini u cap., 2009; Mahdi Ojagh u cap., 2010*) до око 40 МПа (*Bonilla u cap., 2013; Shen u Kamden, 2015*), па чак и до 70 МПа (*Bonilla u cap., 2012*). За биополимерне филмове на бази деривата целулозе, TS вредности су се кретале од 10 МПа (*Dashipour u cap., 2015; Abdollahi u cap., 2019*) до око 60 МПа (*Sánchez-González u cap., 2009*), док су за филмове на бази алгината забележене TS вредности око 70 МПа (*Benavides u cap., 2012*). За биополимерне филмове на бази протеина, TS вредности су се кретале од 2,3 МПа за филмове на бази протеина сунцокрета (*Salgado u cap., 2013*) до око 6 МПа за филмове на бази протеина изолованих из рибе (*Pires u cap., 2011; Pires u cap., 2013; Teixeira u cap., 2014*), и 11 МПа за филмове на бази изолата соја протеина (*Atares u cap., 2010*) и казеина (*Aliheidari u cap., 2013*). Добијене су нешто мало веће вредности за филмове на бази желатина, и кретале су се од 17 МПа (*Matrucci u cap., 2015*) до 33,35 МПа (*Ahmad u cap., 2012*), и 50 МПа (*Tongnuanchan u cap., 2012*), у зависности од супстрата из ког је желатин изолован.

Међутим, када су у питању ЕАВ вредности биополимерних филмова, протеински филмови су показали мало веће вредности у поређењу са филмовима на бази полисахарида. Филмови на бази протеина рибе (*Pires u cap., 2011; Pires u cap., 2013; Teixeira u cap., 2014*) су имали ЕАВ вредности око 148 %, док су за протеинске филмове на бази желатина (*Ahmad u cap., 2012; Tongnuanchan u cap., 2012; Matrucci u cap., 2015*) и соја протеин изолата (*Atares u cap., 2010*) ЕАВ вредности биле мања од 10 %, а око 30 % за филмове на бази протеина сунцокрета (*Salgado u cap., 2013*), и 60 % за филмове на бази казеина (*Aliheidari u cap., 2013*). Док су полисахаридни филмови на бази хитозана имали ЕАВ вредности од 20 % до 30 % (*Hosseini u cap., 2009; Ojagh u cap., 2010; Sánchez-González u cap., 2010; Mahdi Moradi u cap., 2012*), на бази деривата целулозе, ЕАВ вредности су варирале од 0,10 % (*Sánchez-González u cap., 2009*) до 80 % (*Hasheminya u cap., 2019*), док је за алгинатне филмове ЕАВ вредност износила 2,2 % (*Benavides u cap., 2012*).

Инкорпорирање етарских уља у концентрацији од 1 % у биополимерне филмове на бази РnОС, није довело до значајне промене у TS вредности контролног филма, независно од врсте етарског уља ( $p > 0,05$ ), док је са повећањем концентрације етарског уља запажено значајно смањење TS вредности ( $p < 0,05$ ), које се повећавало са порастом концентрације. Добијен је нешто већи утицај етарског уља *O. basilicum* на смањење TS вредности, у поређењу са додатком етарског уља *S. montana* (**Слика 4.10.**).

Многа истраживања су добила смањење TS вредности биополимерних протеинских филмова након додатка различитих етарских уља (*Pires u cap., 2011; Ahmad u cap., 2012; Aliheidari u cap., 2013; Pires u cap., 2013; Hosseini u cap., 2015; Matrucci u cap., 2015*) као и код неких полисахаридних филмова (*Hosseini u cap., 2009; Sánchez-González u cap., 2010; Wang*

*u cap.*, 2011; *Benavides u cap.*, 2012; *Moradi u cap.*, 2012; *Shen u Kamden*, 2015; *Abdollahi u cap.*, 2019).

Смањење TS вредности је најчешће праћено повећањем или смањењем ЕАВ вредности. На основу резултата добијених у овом истраживању, са додатком етарских уља *S. montana* и *O. basilicum*, дошло је и до смањења ЕАВ вредности добијених филмова, за скоро 50 %, без неког значајног утицаја врсте додатог етарског уља ( $p > 0,05$ ) (**Слика 4.11.**). Слична запажања забележена су код филмова на бази хитозана након додатка етарског уља бергамота (*Sánchez-González u cap.*, 2010), цитронела и кедра (*Shen u Kamden*, 2015), као и *Zatara multiflora Boiss* етарског уља (*Moradi u cap.*, 2012). Такође, код неких протеинских филмова на бази желатина са додатком етарских уља оригана и лаванде (*Matrucci u cap.*, 2015), протеина изолованих из ослића са додатком етарског уља тимола (*Pires u cap.*, 2011) и естрагона (*Pires u cap.*, 2013), и казеинских филмова са додатком *Matricaria recutita* етарског уља (*Aliheidari u cap.*, 2013).

Добијени резултати показују да додаток хидрофобних једињења највероватније доводи до механичког инкорпорирања ових компоненти у макромолекулску мрежу филмова, и немогућност формирања веза међу макромолекулима филма, што проузрокује мању затезну јачину потребну да дође до пуцања филма. Такође, додаток хидрофобних једињења у филмогену суспензију може довести до смањења покретљивости полимерних ланаца, и проузроковати смањење еластичности филма и механичке отпорности (*Sánchez-González u cap.*, 2009). Нове полимер-уље везе које су створене у филму су најчешће значајно слабије од полимер-полимер веза (*Shojaee-Aliabadi u cap.*, 2013). Осим тога, додаток липофилних компоненти може довести до смањења садржаја воде у биополимерним филмовима, што утиче на флексибилност и пластичност филмова јер вода има улогу пластификатора код биополимерних материјала (*Hasheminya u cap.*, 2019).

#### 4.2.2. Физичко-хемијске особине

Физичко-хемијске особине, **садржај воде (МС), укупна растворљивост (TSM) и бубрење**, активних биополимерних филмова на бази РuОС са различитим концентрацијама (1-5 %) етарског уља *S. montana* или *O. basilicum*, дате су у **Табели 4.7.**

На основу добијених резултата, највећи допринос инкорпорирања етарских уља у РuОС филмове запажен је код бубрења, где је дошло до значајног смањења бубрења контролног филма са додатком етарских уља ( $p < 0,05$ ). Ово смањење износило је 28 % са додатком 5 % етарског уља *S. montana*, односно 37 %, са додатком 5 % етарског уља *O. basilicum*. Значајан утицај различитих концентрација додатих етарских уља није запажен

( $p > 0,05$ ) (**Табела 4.7.**). Додатак хидрофобних компоненти у биополимерне филмове може повећати површинску хидрофобност филмова и на овај начин смањити афинитет филма према води, односно интеракције између компоненти филма и молекула воде (Peng и Li, 2014; Abdollahi и сар., 2019).

Биополимерни филмови на бази  $PuOC$  су показали нешто ниже вредности МС (19,78 %) у поређењу са биополимерним полисахаридним филмовима, као што су хитозански филмови чије су се вредности МС кретале око 27,16 % (Hafsa и сар., 2016) и 55,71 % (Shen и Kamden, 2015) карбоксиметил целулоза филмови, где су МС вредност биле око 24 %, (Dashipour и сар., 2015); кефиран-карбоксиметил целулоза филм, са МС вредностима око 29,73 % (Hashemnya и сар., 2019); као и протеински филмови на бази протеина сунцокрета, чије су МС вредност биле 28,9 % (Salgado и сар., 2013).

**Табела 4. 7.** Физичко-хемијске особине активних биополимерних филмова на бази  $PuOC$  и етарског уља *S. montana* или *O. basilicum*

	Садржај воде, %	Укупна растворљивост, %	Бубрење, %
контрола	19,78 ± 0,63 <sup>c</sup>	36,03 ± 0,78 <sup>abc</sup>	147,84 ± 5,82 <sup>c</sup>
<b>ЕО, % (v/v)</b>	<b>етарско уље <i>S. montana</i></b>		
1	17,21 ± 1,67 <sup>bc</sup>	35,91 ± 2,32 <sup>abc</sup>	123,38 ± 8,46 <sup>b</sup>
2	18,71 ± 0,27 <sup>bc</sup>	39,42 ± 0,60 <sup>c</sup>	115,63 ± 9,02 <sup>b</sup>
3	17,80 ± 0,99 <sup>bc</sup>	37,76 ± 0,56 <sup>bc</sup>	109,90 ± 3,49 <sup>ab</sup>
4	17,18 ± 1,40 <sup>bc</sup>	37,74 ± 0,57 <sup>bc</sup>	108,26 ± 9,70 <sup>ab</sup>
5	19,21 ± 0,83 <sup>bc</sup>	35,91 ± 2,32 <sup>abc</sup>	106,68 ± 3,05 <sup>ab</sup>
	<b>етарско уље <i>O. basilicum</i></b>		
1	17,72 ± 0,95 <sup>bc</sup>	34,06 ± 0,77 <sup>ab</sup>	105,35 ± 14,21 <sup>ab</sup>
2	19,49 ± 0,35 <sup>bc</sup>	34,58 ± 0,51 <sup>ab</sup>	106,86 ± 4,63 <sup>ab</sup>
3	18,88 ± 0,33 <sup>bc</sup>	33,79 ± 0,72 <sup>a</sup>	112,67 ± 11,82 <sup>ab</sup>
4	17,05 ± 0,47 <sup>ab</sup>	34,34 ± 1,07 <sup>ab</sup>	105,04 ± 5,14 <sup>ab</sup>
5	14,38 ± 1,05 <sup>a</sup>	36,60 ± 1,70 <sup>abc</sup>	93,92 ± 2,96 <sup>a</sup>

\* Различита слова указују на значајне разлике међу узорцима у колонама ( $p < 0,05$ )

Додатак етарског уља *S. montana* у биополимерне филмове на бази  $PuOC$ , није значајно утицало на МС вредности контролног филма ( $p > 0,05$ ), док је утицај додатка етарског уља *O. basilicum* на смањење вредности МС контролног филма, запажен тек са додатком уља у концентрацији од 4 % и 5 % ( $p < 0,05$ ) (**Табела 4.7.**).

На основу литературних навода, до смањења МС биополимерних филмова дошло је и приликом инкорпорирања *Eucalyptus globulus* етарског уља (Hafsa и сар., 2016), етарског уља цимета (Mahdi Ojagh и сар., 2010), цитронела и кедар (Shen и Kamden, 2015) и етарског уља каранфилића (Wang и сар., 2011) у филмове на бази хитозана, *Zataria multiflora*

етарског уља у карбоксиметил целулоза филм (*Dashipour u cap., 2015*) и *Satureja Khuzestanica* етарског уља у биокомполитни филм кефиран-карбоксиметил целулоза (*Hasheminya u cap., 2019*). Смањење процента МС биополимерних филмова након додатка етарских уља је последица њихове хидрофобне природе, која проузрокује мању апсорпцију воде од стране филмогеног матрикса.

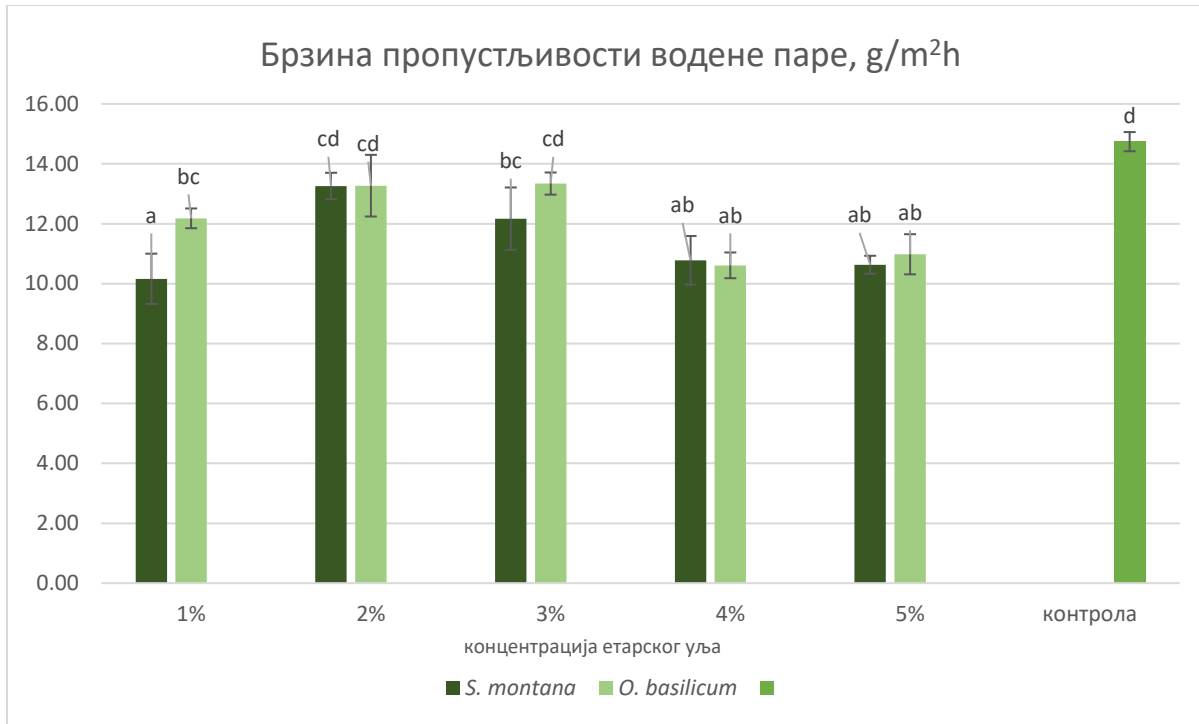
Вредност TSM за контролни филм је износила 36,03 %, и поређењем са резултатима добијеним за друге биополимерне филмове, филмови на бази РuОС имају нижу растворљивост у води. Вредности TSM за друге протеинске филмове износили су 98 % за желатински филм (*Ahmad u cap., 2012*), 86 % за казеински филм (*Alheidan u cap., 2013*), 66 % за филм на бази протеина изолованог из ослића (*Pires u cap., 2013*) и 93,2 % за филм на бази протеина сунцокрета (*Salgado u cap., 2013*). На основу добијених резултата, додаток различитих концентрација етарских уља *S. montana* или *O. basilicum* у филмове на бази РuОС, није показао значајан утицај на TSM вредности ( $p > 0,05$ ) (**Табела 4.7.**).

### 4.2.3. Баријерне особине

**Брзина пропустљивости водене паре (WVTR)** активних биополимерних филмова на бази РuОС са различитим концентрацијама (1-5 %) етарских уља *S. montana* или *O. basilicum*, дате су на **Слици 4.12.**

На основу добијених резултата, није запажен значајан утицај врсте и концентрације додатог етарског уља у концентрацијама од 1 % до 3 % ( $p > 0,05$ ) на WVTR вредности контролног филма, док се запажа значајан утицај инкопорирања виших концентрација (4 % и 5 %) етарских уља, када је дошло до смањења WVTR контролног филма ( $p < 0,05$ ), за око 28 % са додатком етарског уља *S. montana*, односно 26 %, са додатком етарског уља *O. basilicum*.

Смањење пропустљивости водене паре (WVP) полисахаридних филмова, на бази кефиран-карбоксиметил целулоза (*Hasheminya u cap., 2019*) и карагинана (*Shojaee-Aliabadi u cap., 2013*), са додатком различитих врста етарских уља из рода *Satureja*, као што су *Satureja Khuzestanica* и *Satureja hortensis*, редом, је забележено у литератури. Међутим, *Bonilla u cap. (2012)* и *Bonilla u cap. (2013)* су добили повећање пропустљивости водене паре (WVP) хитозанског и композитног филма на бази скроба и хитозана, са додатком етарског уља *O. basilicum*.



**Слика 4. 12.** Брзина пропустљивости водене паре активних биополимерних филмова на бази RuO<sub>2</sub> и етарског уља *S. montana* или *O. basilicum*. Различита слова указују на значајне разлике међу узорцима ( $p < 0,05$ ).

Пренос водене паре углавном се одвија преко хидрофилног дела филма и управо зависи од односа хидрофилних и хидрофобних компоненти у филму (Abdolahi *u cap.*, 2019). Hashemnya *u cap.* (2019) су предложили да је до смањења пропустљивости водене паре код биополимерних филмова након додатка етарских уља, дошло услед хидрофобне природе монотерпенских угљоводоника, основних компоненти етарског уља. Висок садржај монотерпена у етарског уља *S. montana* и *O. basilicum* је потврђен применом GC/MS хроматографске анализе (Поглавље 4.1.1.; Табела 4.1.; Поглавље 4.1.2.; Табела 4.2.). Поред тога, додаток хидрофобних компоненти, у биополимерне филмове, може довести до стварања интеракција између хидрофобних молекула етарског уља и полимера филма, смањујући број доступних хидроксилних група, што доводи до смањења пропустљивости водене паре (Pranoto *u cap.*, 2005; Siripatrawan *u Harte*, 2010; Amankwaah, 2013; Wang *u cap.*, 2013). Хидрофобна природа етарских уља може довести до повећања хидрофобности биополимерних филмова и на тај начин смањити миграцију водене паре кроз материјал (Tongnuanchan *u cap.*, 2013).

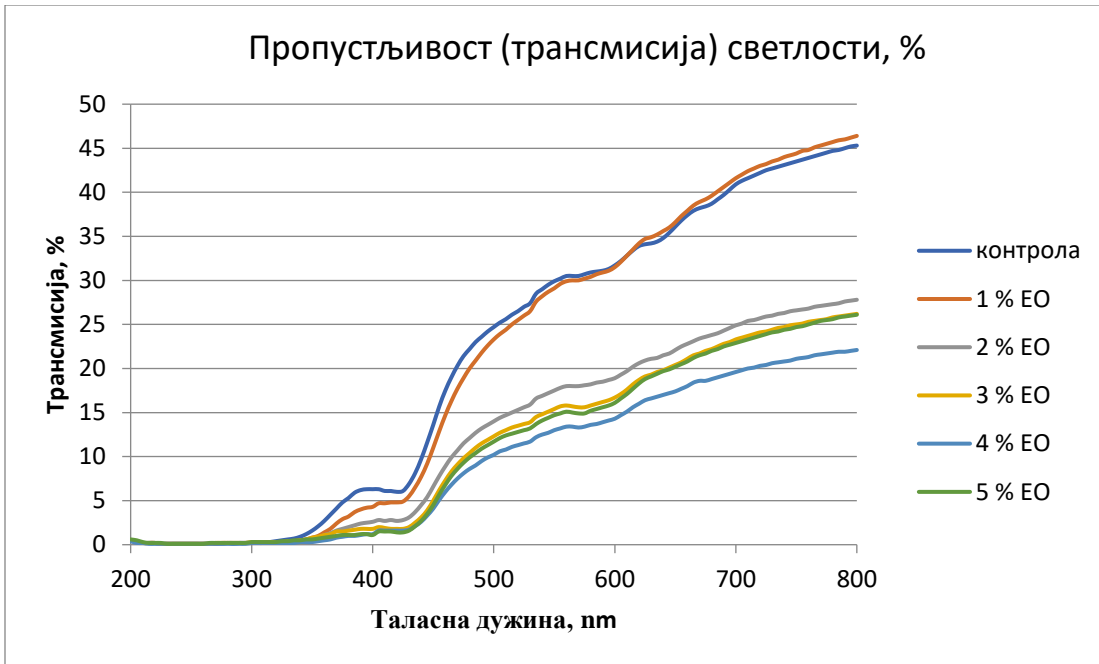
**Пропустљивост (трансмисија) светлости** од 200 nm до 800 nm, активних биополимерних филмова на бази RuO<sub>2</sub> са различитим концентрацијама (1-5 %) етарског уља *S. montana* или *O. basilicum*, дата је на **Слици 4.13.** и **Слици 4.14.**, редом, и изражена у виду трансмисије светлости (%).

На основу добијених резултата, сви биополимерни филмови су имали трансмисију светлости мању од 1 % у опсегу таласних дужина од 280 nm до 200 nm, подручје типично за UV зраке. Овај део светлосног спектра може да изазове различите реакције у упакованом прехранбеном производу, као и промене у његовом квалитету.

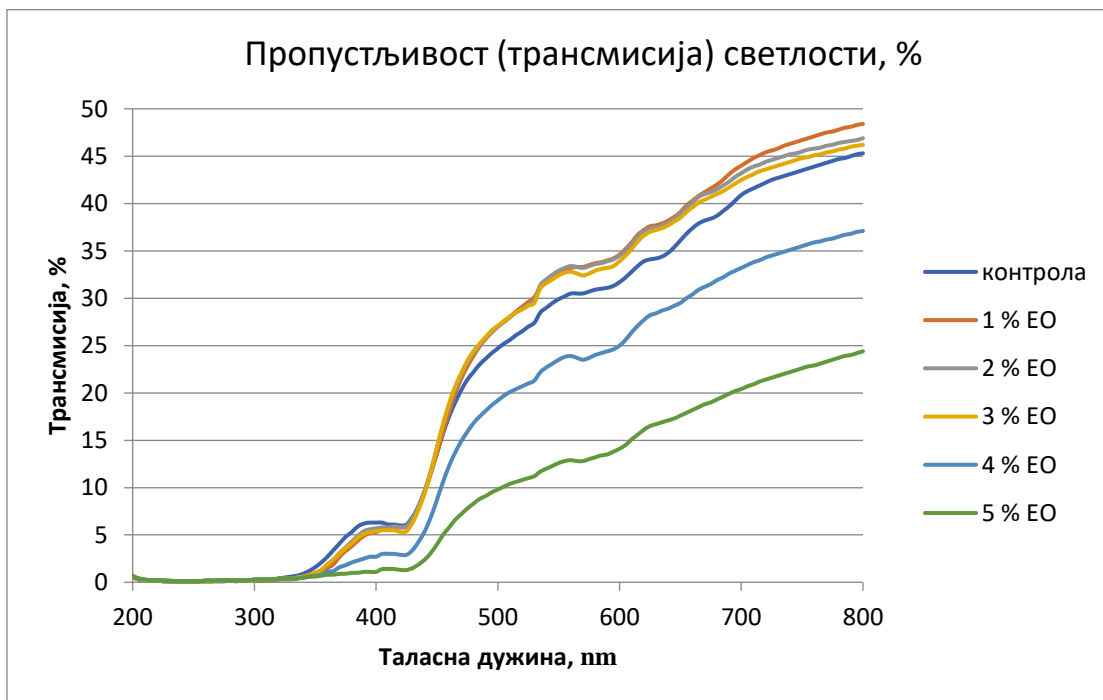
Трансмисија видљивог дела светлосног спектра контролног филма у опсегу од 350 nm до 800 nm, кретала се од 0,3 % до 48,4 %, редом. У поређењу са осталим протеинским филмовима, филмови на бази РuОС показују значајно ниже вредности трансмисије светлости, која је код филмова на бази желатина варира од 75,45 % (350 nm) до 90,03 % (800 nm) (*Tongnuanchan u cap., 2013*); код композитног филма на бази желатина и хитозана, од 61,75 % (350 nm) до 79,00 % (800 nm) (*Ramziia u cap., 2018*) и од 55,75% (350 nm) до 83,78% (800 nm) (*Hosseini u cap., 2015*). Такође, ниже вредности су запажене и поређењем са неким полисахаридним филмовима, где су се вредности код алгинатних филмова кретале у опсегу од 76,00 % (350 nm) до 89,57 % (800 nm) (*Norajit u cap., 2010*). Код биокомпозитног филма на бази кефирана и карбоскиметил целулозе, вредности су се кретале између 37,98 % и 95,10 % (200-800 nm) (*Hasheminya u cap., 2019*).

Претпоставља се да је ниска пропустљивост светлости филмова на бази протеина највероватније узрок њиховог хемијског састава, односно великог саржаја ароматичних аминокиселина које су способне да апсорбују UV светлост (*Abdelhedi u cap., 2018; Hosseini u cap., 2015*). Ароматичне аминокиселина пронађене су и у аминокиселинском саставу погаче уљане тикве голице (*Porović, 2013*).

Са додатком етарских уља у РuОС филмове, трансмисија светлости је значајно смањена. Са повећањем концентрације додатих етарских уља, запажено је и веће смањење. На таласној дужини од 800 nm, трансмисија светлости контролног филма се смањила за око 51 % са додатком 4 % етарског уља *S. montana*, и за око 46 % са додатком 5 % етарског уља *O. basilicum*. Смањење трансмисије светлости са додатком различитих етарских уља у биополимерне филмове већ је забележено у литератури (*Ahmad u cap., 2012; Tongnuanchan u cap., 2012; Tongnuanchan u cap., 2013; Wu u cap., 2014; Hosseini u cap., 2015; Hasheminya u cap., 2019*). Сматра се да до смањења долази због присуства полифенолних компоненти присутних у етарским уљима, и бензенових прстенова које садрже полифеноли, способни да повећају апсорпцију светлости (*Ramziia u cap., 2018*).



Слика 4. 13. Пропустљивост светлости активних биополимерних филмова на бази *PiOS* и етарског уља *S. montana* у различитим концентрацијама (1 – 5 % (v/v))



Слика 4. 14. Пропустљивост светлости активних биополимерних филмова на бази *PiOS* и етарског уља *O. basilicum* у различитим концентрацијама (1 – 5 % (v/v))



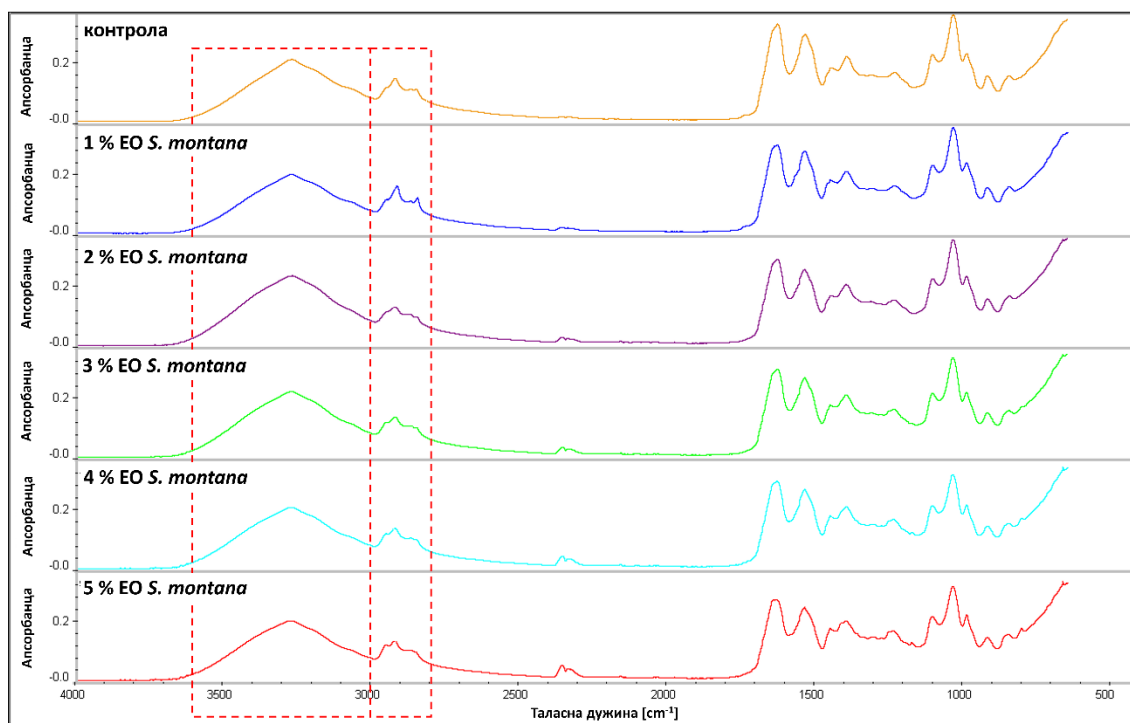
Добијени резултати указују на то да би активни филмови на бази РnОС могли да спрече оскидацију липида код упакованих прехранбених производа коју може да изазове UV светлост.

#### 4.2.4. Структурне особине

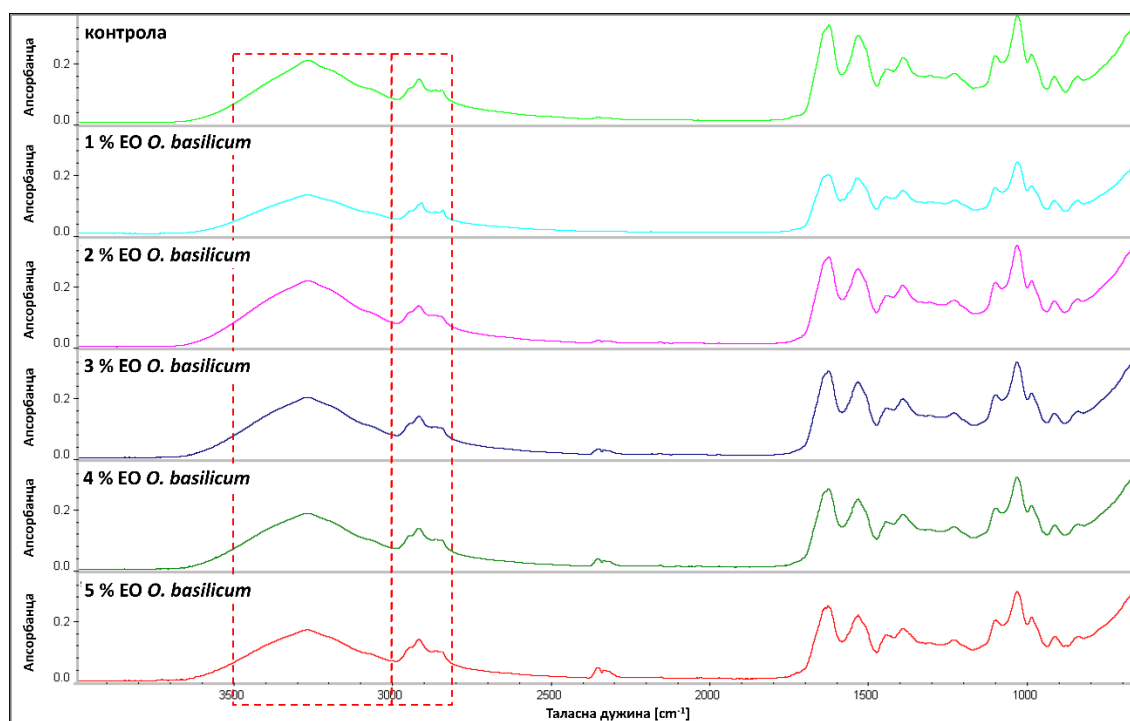
**FTIR спектри** активних биополимерних филмова на бази РnОС са различитим концентрацијама (1-5 %) етарског уља *S. montana* или *O. basilicum*, дати су на **Слици 4.15.** и **Слици 4.16.**, редом.

Генерално, спектри свих активних филмова показују главне пикове који су карактеристични за молекуле протеина (*Поровић, 2013*):

- пикови добијени у спектралној области таласних дужина између 3700-3000 ( $\text{cm}^{-1}$ ), одговарају Амиду А ( $\approx 3500 \text{ cm}^{-1}$ ) и Амиду Б ( $\approx 3100 \text{ cm}^{-1}$ ). Ови пикови потичу од веза формираних између аминокиселина, и у вези су са вибрацијама истезања О-Н и N-Н веза (*Soares u cap., 2009*);
- пикови добијени у спектралној области таласних дужина између 3000-2800 ( $\text{cm}^{-1}$ ), су пикови настали услед апсорпције истезања C-Н везе (*Secundo u Guerrieri, 2005*);
- апсорпционе везе присутне у спектралној области таласних дужина између 1600 и 1700  $\text{cm}^{-1}$  представљају везе из Амид I групе, која потиче од вибрације истезања C = O везе (70–85 %) и у директном односу је са конформацијом примарне структуре; као и везе од Амид II групе, које потичу од вибрације везивања N-Н веза (40-60 %) и вибрације истезања C-N веза (18-40 %) (*Robertson u cap., 2006*). Амид I и Амид II групе су две главне регије инфрацрвеног спектра протеина. Ове вибрације, као и сам апсорпциони простор, су конформационо веома осетљиви (*Venyaminov u Kalnin, 1990*);
- пикови добијени у спектралној области таласних дужина између 1200-1300 ( $\text{cm}^{-1}$ ) одговарају Амид III групи, које потичу из вибрације истезања C – N и N-Н веза, или вибрација CH<sub>2</sub> група (*Abdelhedi u cap., 2018; Ramziia u cap., 2018; Tongnuanchan u cap., 2012*);
- пик добијен у спектралној области таласних дужина од 1030 до 1045  $\text{cm}^{-1}$  је присутан у спектрима свих узорака и одговара ОН групи, која потиче углавном из глицерола који је коришћен као пластификатор приликом синтезе ових биополимерних активних филмова (*Tongnuanchan u cap., 2012; Tongnuanchan u cap., 2013; Abdelhedi u cap., 2018; Zhang u cap., 2018*).



**Слика 4. 15.** FTIR спектри активних биополимерних филмова на бази РиОС и етарског уља *S. montana* у различитим концентрацијама (1 – 5 % (v/v))



**Слика 4. 16.** FTIR спектри активних биополимерних филмова на бази РиОС и етарског уља *O. basilicum* у различитим концентрацијама (1 – 5 % (v/v))

Инкорпорирање етарских уља у филмове на бази  $\text{PuOS}$ , генерално није довело до значајних промена спектра контролног филма. Спектри активних филмова показују сличне карактеристичне, главне пикове, док се једине промене запажају у амплитудама односно апсорбанцама карактеристичних пикова. Највећа промена амплитуде, односно апсорбанце пика, са додатком етарског уља *S. montana* или *O. basilicum* у биополимерни филм на бази  $\text{PuOS}$ , запажа се у спектралној области  $3500\text{--}3000\text{ (cm}^{-1}\text{)}$ , где је дошло до смањења апсорбанце пика, а са повећањем концентрације додатог етарског уља, ово смањење расте. Ова спектрална област одговара вибрацијама истезања  $\text{O-H}$  и  $\text{N-H}$  веза, и највероватније да долази до смањења апсорбанце услед смањења доступности ових група и веза, приликом формирања нових веза и реакција са компонентама филма. *Arrieta u cap. (2013)* су такође запазили смањење интензитета пика на таласној дужини од  $3300\text{ cm}^{-1}$  са додатком карвакрола у натријум и калцијум казеин филм, сугеришући да ови резултати указују на смањење хидрофилног карактера филма. Веће смањење апсорпције пика запажено је код филмова са додатком етарског уља *O. basilicum* у поређењу са филмовима са додатком етарског уља *S. montana* што би могло да указује на мањи хидрофилни карактер  $\text{PuOS}$  филмова са етарског уља *S. montana*, односно већи хидрофобни карактер  $\text{PuOS}$  филмова са етарским уљем *O. basilicum*. Ови резултати су у сагласности са резултатима добијеним за физичко-хемијске особине  $\text{PuOS}$  филмова (**Поглавље 4.2.2.; Табела 4.7.**), где су филмови са додатком етарским уљем *O. basilicum* показали нешто нижу осетљивост према води и воденој пари, у поређењу са филмовима са додатком етарског уља *S. montana*.

Са додатком етарских уља у  $\text{PuOS}$  филмове дошло је и до повећање пика у спектралној области таласних дужина између  $3000\text{--}2800\text{ (cm}^{-1}\text{)}$ , која одговара метилен асиметричним вибрацијама истезања алифатичних  $\text{C-H}$  веза у  $\text{CH}_2$  групама, као и метилен симетричним вибрацијама истезања алифатичних  $\text{C-H}$  веза у  $\text{CH}_3$  групама (*Guillén u Cabo, 1997; Guillén u Cabo, 2004; Tongnuanchan u cap., 2012; Wu u cap., 2014*). Са повећањем концентрације додатих етарских уља, уочено је и повећање апсорпције овог пика. *Wu u cap. (2014)* и *Tongnuanchan u cap. (2012)* су дошли до сличног запажања након инкорпорирања етарског уља оригана у желатин-хитозански филм, и етарског уља цитруса у желатиснски филм, редом. Ове везе су, очигледно, присутне код већине липида (*Guillén u Cabo, 2004; Tongnuanchan u cap., 2012*), и због тога додаток етарских уља повећава хидрофобне групе биополимерног филма ( $\text{C-H}$  од  $\text{CH}_2$  и  $\text{CH}_3$ ), што такође може довести и до повећања хидрофобности самих филмова, односно до смањења осетљивости филмова на влагу и смањења  $\text{WVTR}$ .

На основу добијених резултата, може се закључити да је додаток етарских уља у  $\text{PuOS}$  филмове довео до смањења апсорпције пикова у спектралној области  $3500\text{--}3000\text{ (cm}^{-1}\text{)}$ , односно до повећања апсорпције пика у спектралној области  $3000\text{--}2800\text{ (cm}^{-1}\text{)}$ , што је у

корелацији са смањењем хидрофилности биополимерних филмова, односно смањења осетљивости филмова према влаги и воденој пари (МС, TSM, бубрење и WVTR). Такође, све ове промене у апсорпцији пикова дају и претпоставку да је дошло до интермолекуларних интеракција између компоненти уља и полимера филма, и формирања већ споменутих полимер-уље веза, које су могле утицати и на смањење механичких особина (TS, EAB) добијених филмова.

#### 4.2.5. Укупан садржај фенола

Укупан садржај фенола (TPC) активних биополимерних филмова на бази PuOC са различитим концентрацијама (1-5 %) етарског уља *S. montana* или *O. basilicum*, дат је **Табели 4.8.** Контролни филм имао је TPC вредност 2,35 mg GK/g. Поређењем са TPC осталих биополимерних филмова на бази полисахарида, PuOC филм је показао нешто већу вредност у односу на карбокси-метил целулозни филм (0,2 mg GK/g) (*Dashipour u cap., 2015; Fasihi u cap., 2019*), хитозански филм (1,95 mg GK/g) (*Ruiz-Navajas u cap., 2013; Hafsa u cap., 2016*) и филм на бази  $\kappa$ -карагинан (1,12 mg GK/g) (*Shojaee-Aliabadi u cap., 2013*). Поређење резултата са биополимерним протеинским филмовима било је отежано јер већина истраживања која се бавила испитивањем и карактеризацијом активних протеинских филмова са додатком различитих етарских уља, није испитивала TPC у филмовима. Разлог овоме може бити чињеница да је ова метода неспецифична за одређивање TPC протеинских филмова јер током испитивања поред фенолних компоненти може доћи и до реакције протеина из филма са *Folin-Ciocalte* реагенсом, што може да омета резултате. Једини резултати који су нађени, а да су у вези са TPC протеинских филмова су дати у истраживању код *Maryam Adilah u Nur Hanani (2019)* који су испитвали TPC филмова на бази протеин изолата соје и добили вредност од 0,008 mg GK/g, што је значајно мање у поређењу са филмовима на бази PuOC.

Након додатка етарских уља у филм на бази PuOC, не запажа се значајан утицај на укупан садржај фенола контролног филма ( $p > 0,05$ ), осим са додатком 5 % етарског уља *S. montana* након чега је дошло до повећања TPC вредности контролног филма са 2,35 mg GK/g (контрола) на 5,64 mg GK/g (5 % етарско уља *S. montana*), односно након додатка 3 % етарског уља *O. basilicum* на 5,52 mg GK/g (3 % етарско уље *O. basilicum*) ( $p < 0,05$ ). Међутим, поређењем TPC вредности самог етарског уља *S. montana* датим у **Поглављу 4.1.5.; Табела 4.3.**, са филмовима на бази PuOC и етарског уља *S. montana*, у истим концентрацијама, запажа се значајно смањење TPC вредности самог етарског уља *S. montana* након његовог инкорпорирања у биополимерне филмове на бази PuOC. Редукција TPC вредности кретала

се од 64 % (након додатка 5 % етарског уља *S. montana*) до чак 97 % (након додатка 3 % етарског уља *S. montana*).

**Табела 4. 8.** Укупан садржај фенола активних биополимерних филмова на бази *PuOC* и етарског уља *S. montana* или *O. basilicum*

Укупан садржај фенола, $\text{mg GK/g}$		
контрола	$2,35 \pm 0,36^{\text{ab}}$	
ЕО, % (v/v)	етарско уље <i>S. montana</i>	етарско уље <i>O. basilicum</i>
1	$1,34 \pm 0,52^{\text{a}}$	$4,61 \pm 1,69^{\text{bc}}$
2	$3,33 \pm 1,30^{\text{abc}}$	$3,24 \pm 1,71^{\text{abc}}$
3	$0,38 \pm 0,55^{\text{ab}}$	$5,52 \pm 1,68^{\text{c}}$
4	$4,73 \pm 0,83^{\text{bc}}$	$2,68 \pm 1,82^{\text{abc}}$
5	$5,64 \pm 0,77^{\text{c}}$	$2,67 \pm 0,56^{\text{abc}}$

\* Различита слова указују на значајне разлике међу узорцима у колонама ( $p < 0,05$ )

Након додатка етарског уља *O. basilicum* у концентрацијама од 1 %, 2 % и 3 % дошло до већег повећања ТРС вредности филмова у поређењу са самим етарским уљем (Поглављу 4.1.5.; Табела 4.3.), док су филмови са 4 % и 5 % етарског уља показали мање вредности у поређењу са самим етарским уљем у истим концентрацијама.

Много веће ТРС вредности забележене су код полисахаридних биополимерних филмова након додатка различитих етарских уља (*Shojaee-Aliabadi u cap., 2013; Ruiz-Navajas u cap., 2013; Jouki u cap., 2014; Dashipour u cap., 2015; Hafsa u cap., 2016; Fasihi u cap., 2019; Hasheminya u cap., 2019*).

Разлог ових мањих ТРС вредности филмова на бази *PuOC*, у поређењу са вредностима осталих филмова у литературним наводима, могу бити због чињенице да су друга истраживања најчешће испитивала ТРС вредности припремљене суспензије филмова у различитим растварачима, најчешће метанол и вода, док су ТРС филмова на бази *PuOC* одређене директним контактом филма са реагенсом, без претходног растварања у неком растварачу. Претходним растварањем филма у одговарајући растварач могуће је постићи бољу екстракцију фенолних компоненти присутних у филму, али одређивањем ТРС вредности директним контактом са реагенсом, остварују се реалнији услови, обзиром да примена активних биополимерних амбалажних материјала најчешће подразумева директан контакт са производом.

#### 4.2.6. Антиоксидативна активност

**Способност неутрализације DPPH радикала** активних биополимерних филмова на бази PuOC са различитим концентрацијама (1-5 %) етарског уља *S. montana* или *O. basilicum*, дата је на **Слици 4.17.**

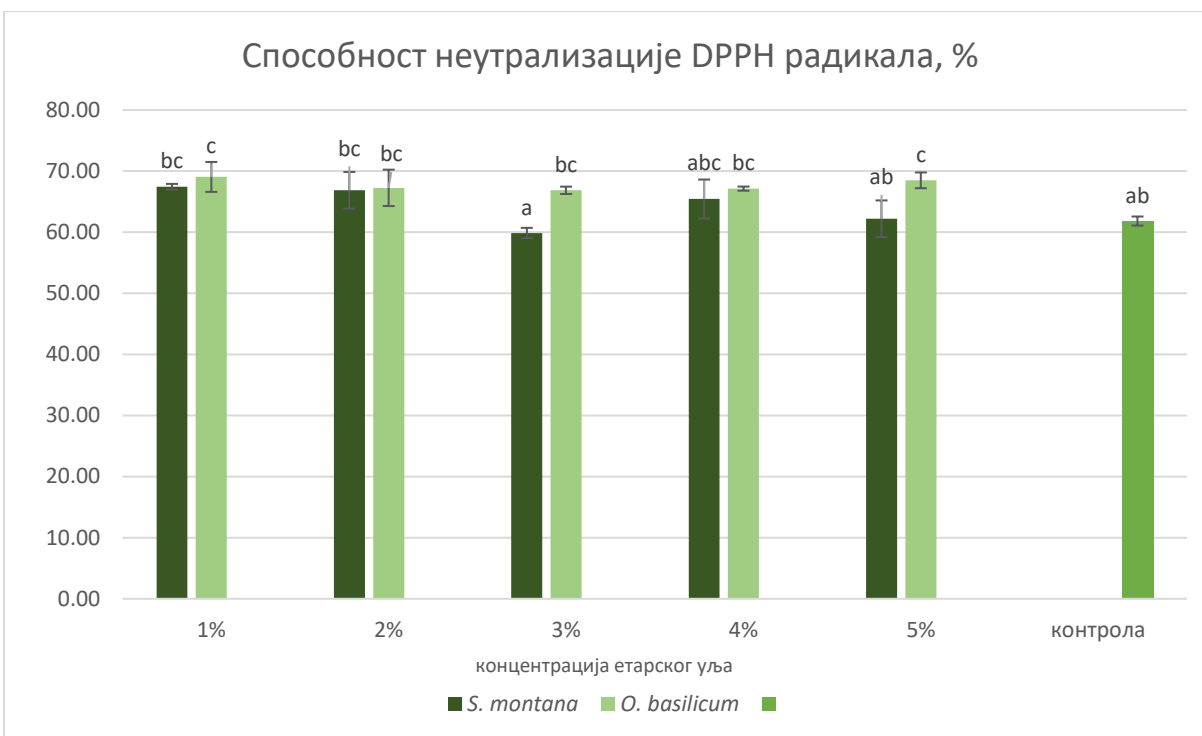
На основу добијених резултата, контролни филм показао је оптималну способност неутрализације DPPH радикала (61,84 %). У литератури је већ забележена антиоксидативна активност филма на бази PuOC без додатка активних једињења, у виду неутрализације •ABTS+ радикала, која се кретала у распону од 20 % до 70 %, у зависности од услова синтезе филмова (*Porović u cap., 2010*). На основу бројних литературних навода, биополимерни филмови на бази протеина показују нешто веће способности неутрализације DPPH радикала (*Pires u cap., 2011; Tongnuanchan u cap., 2012; Pires u cap., 2013*) у поређењу са полисахаридним филмовима (*Norajit u cap., 2010; Moradi u cap., 2012*). Међутим, вредности способности неутрализације DPPH радикала ових протеинских и полисахаридних филмова, биле су мање од 20 %, што је и до три пута мање у поређењу са резултатима добијеним за контролни филм, односно филм на бази PuOC без додатка етарских уља или других активних агенаса.

Са додатком етарског уља *S. montana*, није дошло до значајне разлике у способност неутрализације DPPH радикала у поређењу са контролним филмом ( $p > 0,05$ ). Додатак етарског уља *O. basilicum* у филмове на бази PuOC је повећало способност неутрализације DPPH радикала контролног филма, међутим, није запажен значајан утицај додатка различите концентрације етарског уља на активност филма ( $p > 0,05$ ).

Поређењем са резултатима добијеним за сама етарска уља, дата у **Поглављу 4.1.6.; Табела 4.4.**, може се закључити да сама етарска уља у истим концентрацијама, показују много већу способност неутрализације DPPH радикала ( $p < 0,05$ ), као и да је након њиховог инкорпорирања у биополимерне филмове на бази PuOC дошло до значајне редукције у активности. Могуће да је дошло до губитка испарљивих компоненти етарских уља приликом припреме филма, сушења и складиштења, обзиром да су у питању врло осетљива и испарљива једињења (*Bonilla u cap., 2012; Tongnuanchan u cap., 2012; Pires u cap., 2013; Teixeira u cap., 2014; Fasihi u cap., 2019*).

Иако је активност етарских уља смањена приликом њиховог инкорпорирања у биополимерне филмове на бази PuOC, поређењем са бројним литературним наводима, способност неутрализације DPPH радикала ових филмова је била у опсегу вредности, од око 20 % до око 80 %, добијених за биополимерне филмове са додатком различитих активних агенаса (*Pires u cap., 2011; Moradi u cap., 2012; Shojaee-Aliabadi u cap., 2013; Jouki u*

cap., 2014; Pires u cap., 2013; Teixeira u cap., 2014; Dashipour u cap., 2015; Hafsa u cap., 2016; Fasihi u cap., 2019; Hasheminya u cap., 2019).



**Слика 4. 17.** Способност неутрализације DPPH радикала активних биополимерних филмова на бази PuOC и етарског уља *S. montana* или *O. basilicum*. Различита слова указују на значајне разлике међу узорцима ( $p < 0,05$ ).

**Способност неутрализације OH радикала** активних биополимерних филмова на бази PuOC са различитим концентрацијама (1-5 %) етарског уља *S. montana* или *O. basilicum*, дата је на **Слици 4.18.**

На основу добијених резултата, контролни филм је показао оптималну вредност (33,33 %), која је била и до три пута већа у поређењу са другим биополимерним филмовима, који су показали способност неутрализације OH радикала око 10 % (Abdelhedi u cap., 2018; Zhang u cap., 2018).

Инкорпорирање етарског уља *S. montana* у филм на бази PuOC довело је до повећања активности контролног филма, и до 50,45 % (за филм са 5 % етарског уља *S. montana*). До нешто слабијег пораста дошло је са додатком етарског уља *O. basilicum*, до 47,79 % (за филм са 4 % етарског уља *O. basilicum*).

Ови добијени резултати су упоредиви са резултатима добијеним за бутилирани хидроксианизол, који је показао способност неутрализације OH радикала за 47 %, и нешто нижи у поређењу са резултатима добијеним за L-манитол (71 %). Ова једињења су

коришћена као позитивне контроле за одређивање способности неутрализације ОН радикала филма на бази натријум алгината (Sellimi *u cap.* 2015). Ramziia *u cap.* (2018) су у свом истраживању добили да се проценат неутрализације ОН радикала филмова на бази протеина изолованог из рибе и хитозана са инкорпорираним процијанидином у различитим концентрацијама, кретао од 39,75 % до 89.13 %.

Поређењем са вредностима процента неутрализације ОН радикала самих етарских уља (Поглавље 4.1.6.; Табела 4.4.), запажа се да је активност етарског уља побољшана након инкорпорирања у филмове на бази РuОС. Филмови са етарским уљем *S. montana* су показала нешто већу активност, док се про-оксидативни ефекат етарског уља *O. basilicum* не запажа након инкорпорирања у биополимерне филмове.



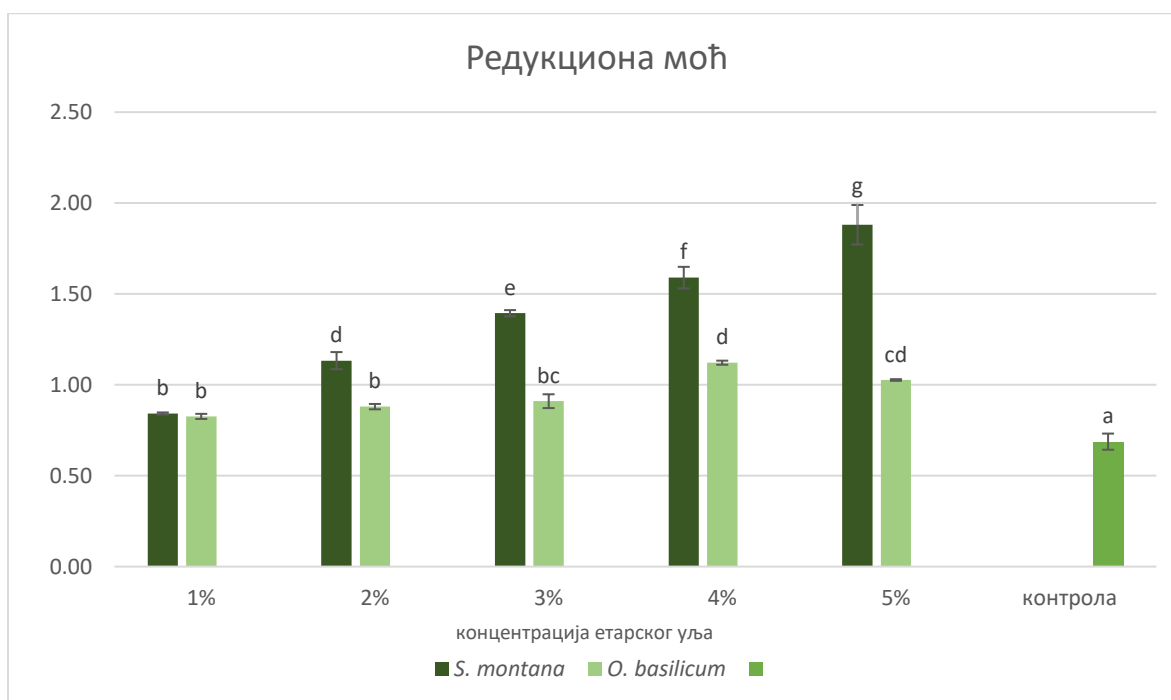
**Слика 4. 18.** Способност неутрализације ОН радикала активних биополимерних филмова на бази РuОС и етарског уља *S. montana* или *O. basilicum*. Различита слова указују на значајне разлике међу узорцима ( $p < 0,05$ ).

**Редукциона моћ** активних биополимерних филмова на бази РuОС са различитим концентрацијама (1-5 %) етарског уља *S. montana* или *O. basilicum*, дата је на **Слици 4.19.**

На основу добијених резултата, редукциона моћ контролног филма била је 0,69, што је нешто више у поређењу са другим биополимерним филмовима, чије вредности редукционе моћи су биле мање од 0,50 (Norajit *u cap.*, 2010; Moradi *u cap.* 2012; Abdelhedi *u cap.*, 2018; Ramziia *u cap.*, 2018).



Са додатком етарских уља у филмове на бази РuОС, дошло је до значајног повећања редукционе моћи контролног филма ( $p < 0,05$ ). Филмови са додатком етарског уља *S. montana*, су показали већу редукциону моћ у поређењу са филмовима са етарским уљем *O. basilicum*. Значајан утицај додатка различите концентрације етарског уља *O. basilicum* није запажен ( $p > 0,05$ ), док је у случају додатка етарског уља *S. montana*, активност контролног филма расла са порастом концентрације додатог етарског уља ( $p < 0,05$ ). Инкорпорирање етарског уља *S. montana* у биополимерне РuОС филмове, довело је до повећања редукционе моћи контролног филма за скоро три пута, са 0,69 (контрола) на 1,88 (филм са 5 % етарског уља *S. montana*). Додатак етарског уља *O. basilicum* повећало је редукциону моћ контролног филма на 1,03 (филм са 5 % етарског уља *O. basilicum*). Редукциона моћ бутилирани хидроксианизол, који је коришћен као позитивна контрола за одређивање редукционе моћи филма на бази натријум алгината, је била око 2 (Sellimi *u cap.* 2015). Само етарско уље *O. basilicum* у истим концентрацијама, показало је ниже вредности редукционе моћи у поређењу са активним филмовима (Поглавље 4.1.6.; Табела 4.4.).



**Слика 4. 19.** Редукциона моћ активних биополимерних филмова на бази РuОС и етарског уља *S. montana* или *O. basilicum*. Различита слова указују на значајне разлике међу узорцима ( $p < 0,05$ ).

На основу добијених резултата може се закључити да је највећи и најзначајнији утицај додатка етарских уља на антиоксидативну активност филмова на бази РuОС, добијен код редукционе моћи, у поређењу са осталим антиоксидативним методама, неутрализација слободних радикала. Разлог може бити у различитом механизму

деловања, односно могуће је да етарска уља инкорпорирана у филм на бази погаче уљане тикве голице, показују већу способност да делују као електрон донори у односу на способност неутрализације радикала.

#### 4.2.7. Антибактеријска активност

Антибактеријска активност активних биополимерних филмова на бази PuOC са различитим концентрацијама (1-5 %) етарског уља *S. montana* или *O. basilicum*, према две грам-негативне бактерије *E. coli* и *S. Enteritidis*, и три грам-позитивне бактерије, *L. monocytogenes*, *S. aureus* и *B. cereus*, дата је у **Табели 4.9.**

На основу добијених резултата, запажа се да контролни филм није показао антибактеријску активност према испитиваним бактеријама.

**Табела 4. 9.** Антибактеријска активност активних биополимерних филмова на бази PuOC и етарског уља *S. montana* или *O. basilicum*

		Зона инхибиције, mm				
		<i>E. coli</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>
контрола		H3	H3	H3	H3	H3
<b>EO, % (v/v)</b>		<b>етарско уље <i>S. montana</i></b>				
1		H3	H3	H3	H3	H3
2		H3	H3	H3	H3	H3
3		10,0 ± 0,0 <sup>aA</sup>	11,0 ± 1,0 <sup>abA</sup>	12,0 ± 0,0 <sup>bAB</sup>	11,0 ± 1,0 <sup>abA</sup>	12,0 ± 0,0 <sup>bA</sup>
4		12,5 ± 0,5 <sup>aB</sup>	13,0 ± 0,0 <sup>aA</sup>	14,0 ± 0,0 <sup>aC</sup>	14,0 ± 1,0 <sup>aB</sup>	17,0 ± 1,0 <sup>bB</sup>
5		13,0 ± 0,0 <sup>aB</sup>	22,0 ± 3,0 <sup>cB</sup>	13,0 ± 0,0 <sup>aBC</sup>	17,5 ± 1,5 <sup>bC</sup>	18,5 ± 0,5 <sup>bcC</sup>
		<b>етарско уље <i>O. basilicum</i></b>				
1		H3	H3	H3	H3	H3
2		H3	H3	H3	H3	H3
3		H3	H3	11,0 ± 1,0 <sup>A</sup>	H3	H3
4		H3	H3	11,0 ± 0,0 <sup>A</sup>	H3	H3
5		H3	H3	13,0 ± 0,0 <sup>aBC</sup>	H3	9,0 ± 0,0 <sup>bD</sup>

\* H3 – нема зоне; Различита мала слова указују на значајне разлике међу узорцима у редовима, док различита велика слова указују на значајне разлике међу узорцима у колонама (p<0,05)

Активни филмови на бази PuOC са инкорпорираним етарским уљем *S. montana* су показали антибактеријску активност према свим испитиваним бактеријама у концентрацијама већим од 2 % (3-5 %). Са порастом концентрације додатог етарског уља, дошло је и до значајног повећања ZI (p<0,05). Најосетљивије бактерије на филмове са

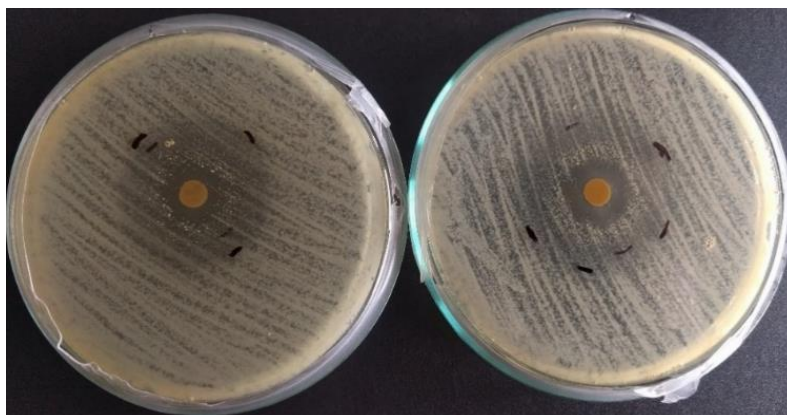
етарским уљем *S. montana*, биле су *S. Enteritidis*, *B. cereus*, и *S. aureus*, редом. Где су добијене ZI биле 11 mm (филм на бази PuOC са 3 % етарског уља), 13 mm (филм на бази PuOC са 4 % етарског уља) и 22 mm (филм на бази PuOC са 5 % етарског уља), код испитивања осетљивости *S. Enteritidis*; односно 12 mm (филм на бази PuOC са 3 % етарског уља), 17 mm (филм на бази PuOC са 4 % етарског уља) и 18 mm (филм на бази PuOC са 5 % етарског уља), у случају испитивања осетљивости *B. cereus*. Као и 11 mm (филм на бази PuOC са 3 % етарског уља), 14 mm (филм на бази PuOC са 4 % етарског уља) и 17,5 mm (филм на бази PuOC са 5 % етарског уља) у случају *S. aureus*.

Најмање осетљиве бактерије биле су *E. coli* и *L. monocytogenes*, међутим, добијене ZI биле су биле у опсегу од 10 mm до 14 mm, што и даље указује на осетљивост ових бактерија према испитиваним филмовима.

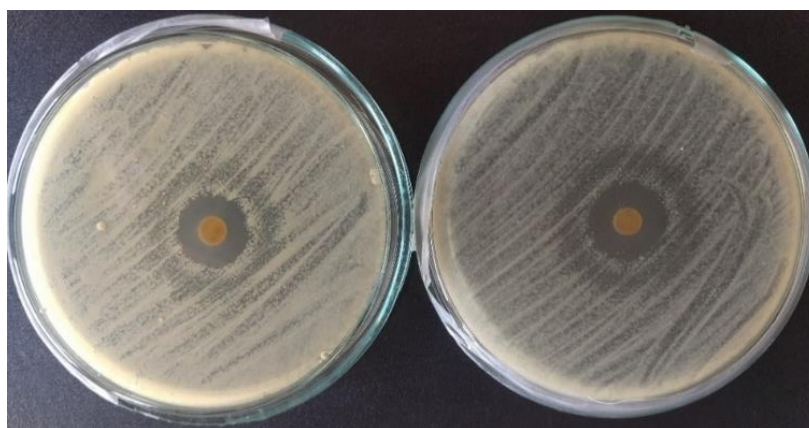
Када се упореде антибактеријске вредности самог етарског уља *S. montana* дате у **Поглављу 4.1.7.; Табели 4.5.**, и активних филмова на бази PuOC са етарским уљем *S. montana*, може се запазити да су сви активни филмови показали више вредности ZI у поређењу са самим етарским уљем у истим концентрацијама, осим у случају испитивања осетљивости *B. cereus*. Објашњење ове појаве није нађено у литератури, међутим неки литературни подаци показују да етарска уља инкапсулирана у биополимерне омотаче су показала већу антимикуробну активност у поређењу са активношћу неинкапсулираног етарског уља (*Varona u cap., 2013; Khalili u cap., 2015; Zhavah u cap., 2015; Kalagatur u cap., 2018*).

Приликом испитивања осетљивости *B. cereus* према биополимерним филмовима на бази PuOC и етарског уља *S. montana*, феномен појаве дуплих инхибиторних зона се може запазити у случају испитивања антибактеријске активности филмова са 4 % (**Слика 4.20.**) и 5 % (**Слика 4.21.**) концентрације додатог етарског уља *S. montana*.

Прва зона инхибиције, потпуно чиста зона, највероватније представља потпуну инхибицију, без раста бактеријских ћелија. У случају друге зоне, која окружује чисту зону, запажен је мањи раст бактеријских ћелија, али не и потпуна инхибиција. Ова зона највероватније представља зону у којој је мањи део активне компоненте био у могућности да дифундује, али та количина није била довољна да изазове потпуну инхибицију. Ова појава би се могла приписати интеракцијама између полифенола и матрикса филма, које могу довести до ометања и смањења дифузије активних компоненти из филмова у подлогу у току времена (*Benavides u cap., 2012; Iturriaga u cap., 2012*). *Pol u cap. (2001)* су у својим истраживањима запазили интеракцију између карвакрола и протеина, што је ограничило антибактеријску активност карвакрола према *B. cereus*.



**Слика 4. 20.** Дупла зона инхибиције активног филма на бази РnОС и етарског уља *S. montana* у концентрацији од 4 % према *B. cereus*



**Слика 4. 21.** Дупла зона инхибиције активног филма на бази РnОС и етарског уља *S. montana* у концентрацији од 5 % према *B. cereus*

Биополимерни филмови на бази РnОС са етарским уљем *O. basilicum*, у свим испитиваним концентрацијама (1-5 %), нису показали активност према *E. coli*, *S. Enteritidis* и *S. aureus*, док је врло слаба активност уочена према *B. cereus* тек при концентрацији додатог етарског уља од 5 %, где је зона инхибиције (ZI) износила 9 mm. Најосетљивија бактерија на РnОС филмове са етарским уљем *O. basilicum* била је *L. monocytogenes*. Међутим, ZI су запажене тек након додатка концентрација етарског уља већих од 2 %, и кретале се од 11 mm (3 % и 4 % етарско уље) до 13 mm (5 % етарско уље). Овако слаба антибактеријска активност филмови на бази РnОС са етарским уљем *O. basilicum* према испитиваним бактеријама је била очекивана, уколико се узму у обзир добијени резултати за антибактеријску активност самог етарског уља *O. basilicum* (Поглавље 4.1.7.; Табела 4.5.), која је још и редукована након инкорпорирања у РnОС филм.

Филмови са додатком етарског уља *S. montana* показали су значајно већу антибактеријску активност у поређењу са филмовима са етарским уљем *O. basilicum*.

*Martucci i cap (2015)* су анализирали биоактивност филмова са додатком етарског уља оригана и лаванде, и добијени резултати су показали да филмови са етарским уљем оригана показују нешто вишу антибактеријску активност услед већег ефекта карвакрола (главне и најзаступљеније компоненте у етарском уљу оригана) у поређењу са линалолом (главне и најзаступљеније компоненте у етарском уљу лаванде). Ови резултати се могу упоредити са резултатима добијеним у овом истраживању јер су карвакрол и линалол потврђене као најдоминантније компоненте у етарском уљу *S. montana*, односно *O. basilicum*, редом.

### 4.3. Карактеризација инклузионог комплекса $\beta$ -циклодекстрин/етарско уље *S. montana*

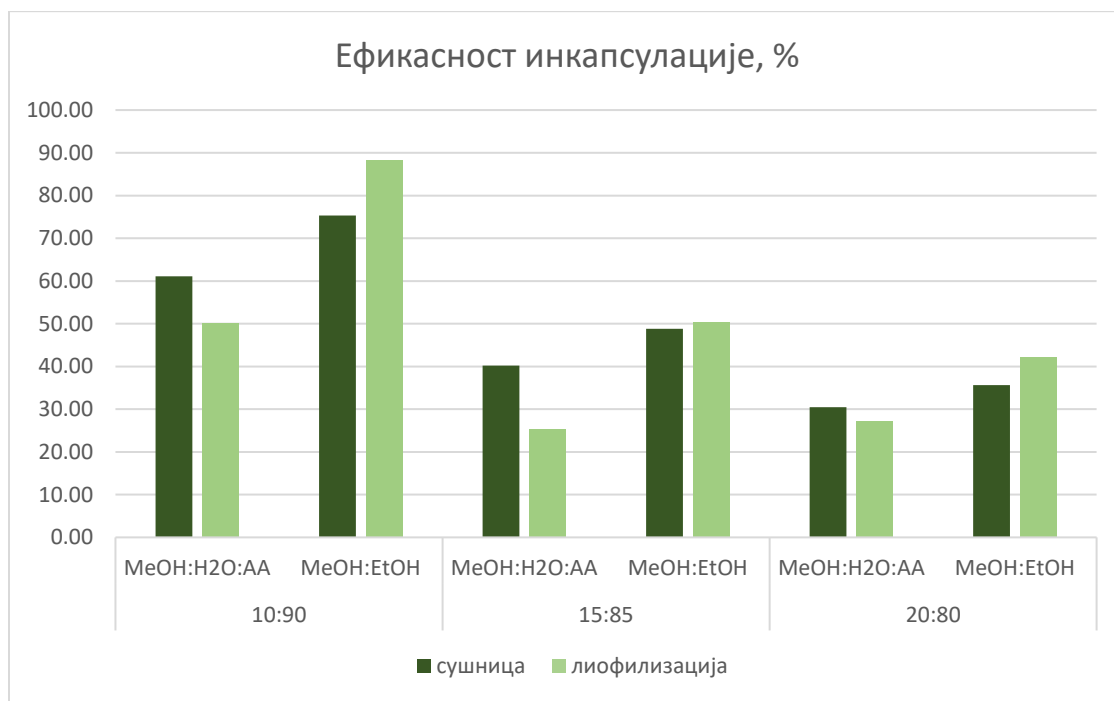
Карактеризација инклузионих комплекса  $\beta$ -циклодекстрин/етарско уље *S. montana* ( $\beta$ -CD/*EOsm*) добијених применом различитих односа етарско уље: $\beta$ -циклодекстрин (10:30; 15:85; 20:80), и применом различитих поступака сушења, сушење у сушници и лиофилизацији, извршена је одређивањем ефикасности инкапсулације, моделом вештачке неуронске мреже, анализе глобалне осетљивости, и структурних особина. Експериментални модел добијања испитиваних инклузионих комплекса дат је у **Поглављу 3.4.1.; Табела 3.1.**

#### 4.3.1. Ефикасност инкапсулације

Ефикасност инкапсулације (ЕЕ) добијених инклузионих комплекса, различитих односа ЕО:  $\beta$ -CD (10:90; 15:85; 20:80), добијених путем два поступка сушења (лиофилизација и сушница), одређена је у два различита растварача метанол:вода:сирћетна киселина (MeOH:H<sub>2</sub>O:AA) и метанол:етанол (MeOH:EtOH), врло често коришћена у литератури за одређивање ЕЕ микрочестица (*Tumbas-Šaroujac u sar., 2016; da Rocha Neto u sar., 2018*). Добијени резултати су представљени на **Слици 4.22.**, и показују да су сва три фактора, однос ЕО: $\beta$ -CD, поступак сушења, као и примењени растварач, имали значајан утицај на добијене вредности ЕЕ.

Највећи проценат ЕЕ имао је инклузиони комплекс код кога је однос ЕО и  $\beta$ -CD био 10:90, добијен поступком лиофилизације, у растварачу MeOH:EtOH, и износио је 88,3 %. Нешто слабији проценат ЕЕ (75,3 %) показао је инклузиони комплекс добијен у истом ЕО:  $\beta$ -CD (10:90) односу, истом растварачу (MeOH:EtOH), али добијен сушењем у сушници. Како је садржај ЕО у честицама растао, тако се проценат ЕЕ добијених честица смањивала. Па је тако најмања ЕЕ добијених честица била код инклузионог комплекса односа ЕО: $\beta$ -CD=20:80, независно од примењеног поступка сушења, као ни од испитиваног растварача. На основу добијених резултата, може се закључити да већи почетни односи ЕО и  $\beta$ -CD дају максимално искоришћење ЕО, односно максимално укључивање ЕО у  $\beta$ -CD шупљину приликом формирања инклузионог комплекса, и минимално неформираних инклузионих комплекса на бази  $\beta$ -CD. Поред тога, добијене су нешто мање вредности ЕЕ код инклузионих комплекса добијених поступком сушења у сушници у поређењу са вредностима ЕЕ инклузионих комплекса добијених поступком лиофилизације,

највероватније услед губитка веома испарљивих и нестабилних фенолних компоненти ЕО *S. montana* током сушења у сушници због примене више температуре (50 °C).



**Слика 4. 22.** Ефикасност инкапсулације инклузионих комплекса рачуната у два растварача: метанол:вода:сирћетна киселина (MeOH:H<sub>2</sub>O:AA) и метанол:етанол (MeOH:EtOH), односа етарско уље (EO):β-циклодекстрин (β-CD)-10:90; 15:85; 20:80, добијени сушењем у сушници или лиофилизатору

*Da Rocha Neto u cap. (2018)* су истраживали утицај различитих фактора на ефикасност инкапсулације β-CD, као и њихов утицај на формирање инклузионог комплекса са различитим етарским уљима. Ови фактори су обухватили и утицај врсте додатог ЕО, концентрације додатог ЕО, примењеног поступка сушења и растварача за одређивање ЕЕ. Добијени резултати су показали да растварач који се користи за одређивање ЕЕ игра велику улогу, и да у овом случају добијена ЕЕ доста зависи од поларности и растворљивости инкапсулиране компоненте, у примењеном растварачу, односно да ће компонента бити више присутна у растварачу уколико је компатабилна са њим. Обзиром да ЕО *S. montana* у највећем проценту садржи изузетно хидрофобну компоненту карвакрол, од очекиваног је да ће његова растворљивост бити слабија у води, односно растварачу који садржи воду (MeOH:H<sub>2</sub>O:AA) у поређењу са органским растварачима, као што је MeOH:EtOH. *Da Rocha Neto u cap. (2018)* су показали да и одабир одговарајућег органског растварача, такође, веома утиче на растворљивост ЕО, односно проценат ЕЕ. Из тог разлога, одабир одговарајућег растварача за одређивање ЕЕ би требало пажљиво размотрити у односу на хемијски састав компоненте која се инкапсулира. Такође би требало узети у разматрање

употребу више различитих растварача, или комбинацију различитих растварача, ради добијања што прецизнијих резултата.

Врста инкапсулираног једињења такође игра важну улогу код ЕЕ, и зависи највише од врсте формираних веза између  $\beta$ -CD и једињења. Осим хемијске интеракције инкапсулираног једињења и  $\beta$ -CD, молекулска маса једињења је један од параметара који директно утиче на ЕЕ, где мања молекулска маса једињења пружа већу могућност инкапсулације и бољу ЕЕ вредност (Herera *u cap.*, 2019). Према Kamimura *u cap.* (2014), карвакрол је једињење мале молекулске масе, што омогућава његову ефикасну инкапсулацију у молекул  $\beta$ -CD.

Концентрација додатог ЕО на формирање инклузионог комплекса, такође игра значајну улогу и у литератури се могу наћи различити подаци. Нека истраживања су показала да са повећањем концентрације ЕО долази и до повећања ЕЕ добијених инклузионих комплекса (Ayala-Zavala *u cap.*, 2008; da Rocha Neto *u cap.*, 2018), док је у неким истраживањима запажен супротан случај, као и код резултата добијених у овом истраживању, где је са повећањем концентрације ЕО дошло до смањења ЕЕ (Anaya-Castro *u cap.*, 2017).

Da Rocha Neto *u cap.* (2018) су потврдили и значајан утицај примењеног поступка сушења за добијање инклузионих комплекса, и показали да и у овом случају велику улогу игра једињење које се инкапсулира. Већа ЕЕ применом поступка сушења у сушници је добијена код инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/ЕО палмарозе, док је нешто већа ЕЕ применом поступка лиофилизације добијена код инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/ЕО аниса (da Rocha Neto *u cap.*, 2018). Овакви резултати зависе од формираних хемијских веза између  $\beta$ -CD и основних компоненти ЕО. Основно једињење најдоминантније у ЕО аниса је *trans*-анетол које ствара јаче везе са протонима  $\beta$ -CD, у поређењу са гераниолом, основне компоненте ЕО палмероза, које је углавном заробљено унутар шупљине  $\beta$ -CD ван дер Ваалсовим интеракцијама (da Rocha Neto *u cap.*, 2018). Услед овако слабе повезаности гераниола са  $\beta$ -CD, могуће да је дошло до губитка гераниола повезаног са молекулима воде у  $\beta$ -CD шупљини, услед сублимације током поступка замрзавања, приликом припреме узорка за сушење у лиофилизатору. До губитка гераниола повезаног са молекулима воде у току сушења у сушници није дошло услед употребе ниже температуре сушења, далеко испод тачке кључања гераниола. За разлику од гераниола и  $\beta$ -CD, јаче везе које су формиране између *trans*-анетола и  $\beta$ -CD, омогућавају овом једињењу да се задржи унутар шупљине  $\beta$ -CD, независно од примењеног поступка сушења. Према Lahcene *u cap.* (2016), интеракција између  $\beta$ -CD и карвакрола, основне и најзаступљеније компоненте у етарском уљу *S. montana*, приликом формирања инклузионог комплекса, успостављају се најчешће ван дер Валсовим везама, које су слабије, али обзиром да је ЕЕ рађена одређивањем укупног



садржаја фенола, добијене вредности ЕЕ одговарају збиру свих фенола заробљених унутар  $\beta$ -CD шупљине.

### Релативни значај утицајних параметара на вредности ефикасности инкапсулације

Модел неуронске мреже (ANN модел) је коришћен за испитивање могућности предвиђање инкапсулације етарског уља *S. montana* у инклузиони комплекс на бази  $\beta$ -CD, у функцији врсте односа ЕО: $\beta$ -CD, врсте сушења, и типа растварача.

Према перформансама ANN, оптималан број неурона у скривеном слоју за ЕЕ вредности је био 3 (мрежа MLP 7-3-1) коефицијента детерминације  $r^2$  (0,999 за ANN током периода тренинга) и ниске вредности суме квадрата одступања (енгл. *sum of squares* - SOS) (Табела 4.10.).

Развијени ANN модел је имао сложену структуру (са 24 тежинска коефицијента) услед изражене нелинеарне природе развијеног система (Montgomery, 1984; Kollo и von Rosen, 2005). Вредност  $r^2$  између експерименталних података и резултата ANN модела ефикасности инкапсулације је била 0,999 циклуса учења ANN мреже.

У Табели 4.11. дати су елементи матрице  $W_1$  и вектора  $B_1$  (представљени у колони за нулту вредност – енгл. *bias*), док су у Табели 4.12. дати елементи матрице  $W_2$  и вектора  $B_2$  (за нулту вредност) за скривени слој, који се користе за прорачун у Једначини 3.8. (Поглавље 3.8.1.), коришћени у прорачуну ЕЕ.

Табела 4. 10. Резиме вештачког модела неуронске мреже (перформансе и грешке) за циклусе обуке, тестирања и валидације

Неуронска мрежа	Перформансе			Грешка			Алгоритам за тренинг	Функција грешке	Активациона функција	
	Трен.	Тест.	Валид.	Трен.	Тест.	Валид.			Валид.	Трен.
MLP 7-3-1	0,999	0,998	0,999	0,000	0,003	0,001	BFGS 10000	SOS	Logistic	Exponential

\*Термин перформансе представља коефицијенте детерминације, док термини грешака указују на грешке ANN модела

Табела 4. 11. Елементи матрице  $W_1$  и вектора  $B_1$  за прорачун ефикасност инкапсулације

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Сушење (лиофилизација)	-1,089	-0,450	-2,044	-4,417	8,600	-0,425	-1,509	-17,072	-4,290	-2,466
Сушење (сушница)	1,095	-0,522	0,373	4,764	-17,973	-1,347	0,020	13,841	5,864	4,528
Однос ЕО: $\beta$ -CD (10:90)	-10,936	-9,631	-10,893	-9,069	-10,622	-12,120	-11,765	-10,847	-8,232	-7,432
Однос ЕО: $\beta$ -CD (15:85)	2,008	0,952	0,408	0,686	11,187	3,400	1,112	7,406	-1,562	0,383
Однос ЕО: $\beta$ -CD (20:80)	8,861	7,828	8,826	8,746	-9,968	7,075	9,211	0,211	11,431	9,075
Растварач (MeOH:EtOH)	-5,003	-3,969	-4,592	-6,111	-18,148	-2,868	-6,774	-0,977	-5,932	-4,196
Растварач (MeOH:H <sub>2</sub> O:AA)	4,976	3,004	2,960	6,528	8,721	1,056	5,148	-2,251	7,530	6,280
Bias	0,017	-0,980	-1,704	0,450	-9,345	-1,747	-1,529	-3,255	1,638	2,016

**Табела 4. 12.** Елементи матрице  $W_2$  и вектора  $B_2$  за прорачун ефикасност инкапсулације

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Bias
EE	1,655	0,935	0,191	-1,521	-16,797	-5,973	2,310	-1,057	-0,176	1,105	0,000

Добијени оптимални модел неуронске мреже је показао добру способност генерализације експерименталних података, и може се користити за прецизно предвиђање EE *S. montana* приликом инкапсулације у  $\beta$ -CD инклузиони комплекс, из широког спектра улазних параметара као што су однос ЕО: $\beta$ -CD, врсте сушења, и типа растварача.

### Оптимизација ANN резултата

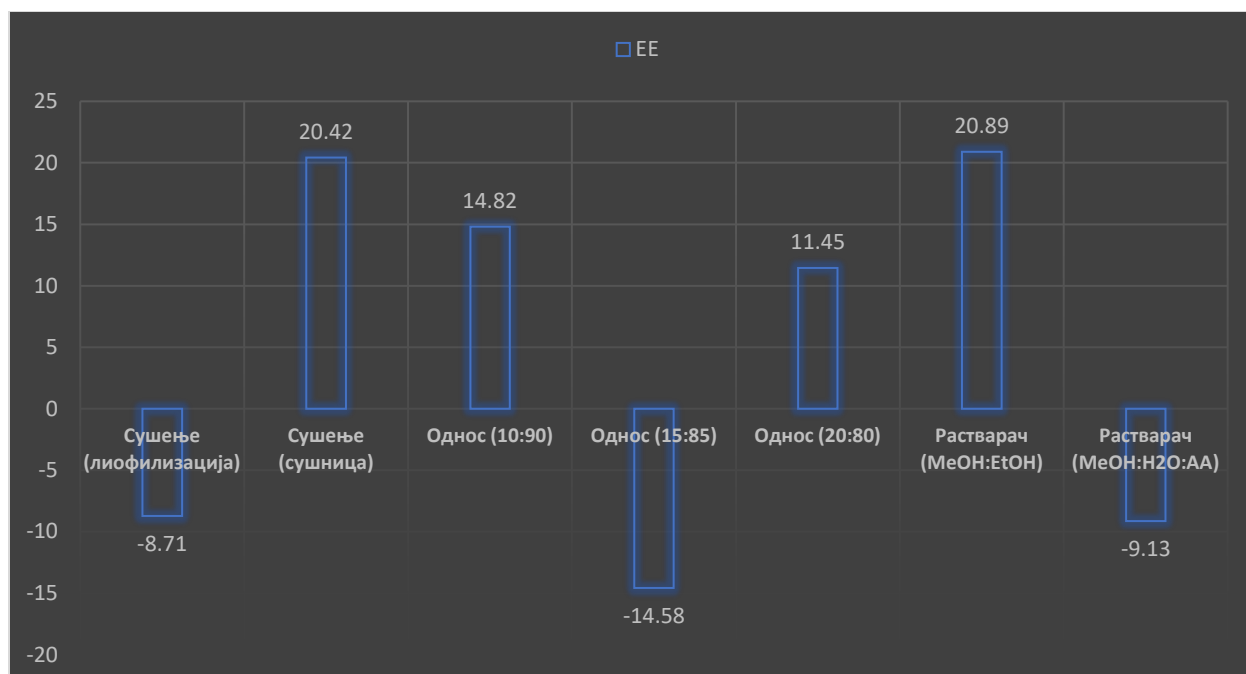
Оптимизација излаза ANN модела изведена је коришћењем резултата представљених у **Табели 4.11.** и **Табели 4.12.**, примењеним у **Једначини 3.8.** (**Поглавље 3.8.1.**). Израчунати максимум EE износио је 88,3 %, а израчунати минимум: 25,3 %. Оптимални излаз је добијен употребом улазних података: врста сушења - лиофилизација, однос ЕО: $\beta$ -CD=10:90 и тип растварача MeOH:EtOH. Ови резултати су у доброј сагласности са експерименталним резултатима.

ANN модел у облику MLP 7-3-1 мреже, коришћен за предвиђање EE вредности показао је добро поклапање са експерименталним резултатима.

### Анализа глобалне осетљивости

Анализа глобалне осетљивости (заснована на *Yool*-овој једначини), која се израчунава на основу ANN резултата показала је утицај улазних променљивих, као што су тип сушења, врста растварача и однос ЕО: $\beta$ -CD на EE вредности.

У овом одељку проучаван је утицај улазних променљивих (однос ЕО: $\beta$ -CD, врста сушења, растварач). На основу добијених резултата представљених на **Слици 4.23.**, тип сушења (сушница) и растварач (MeOH:H<sub>2</sub>O:AA) су били утицајнији параметри за вредности EE, са приближним релативним значајем од 29,42 %, односно 20,89 %, редом, док је утицај односа растварача (10:90 и 20:80) такође, био од значаја на нивоима 14,82 % и -14,58 %, редом.

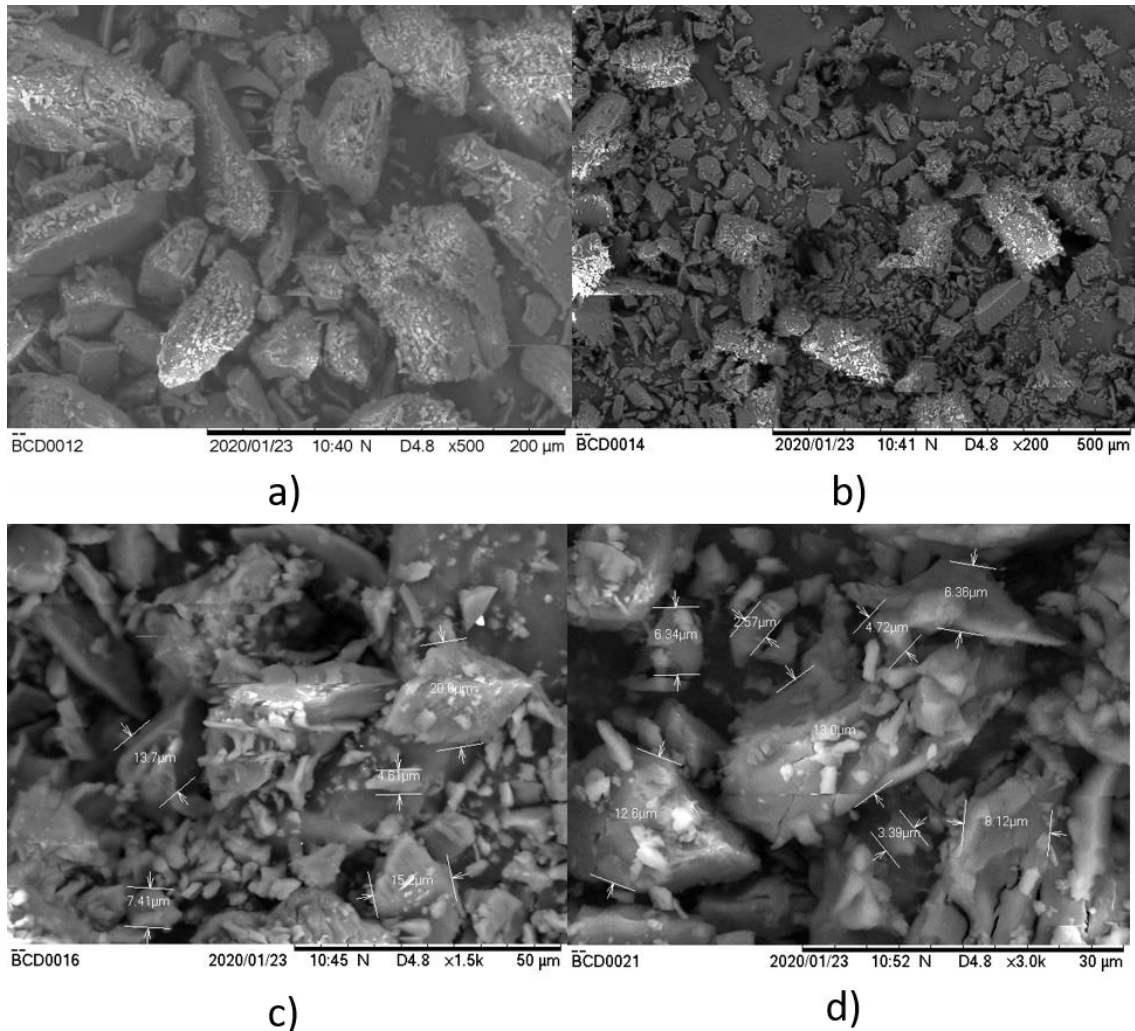


**Слика 4. 23.** Релативни значај утицајних параметара на вредности ефикасност инкапсулације

### 4.3.2. Структурне особине

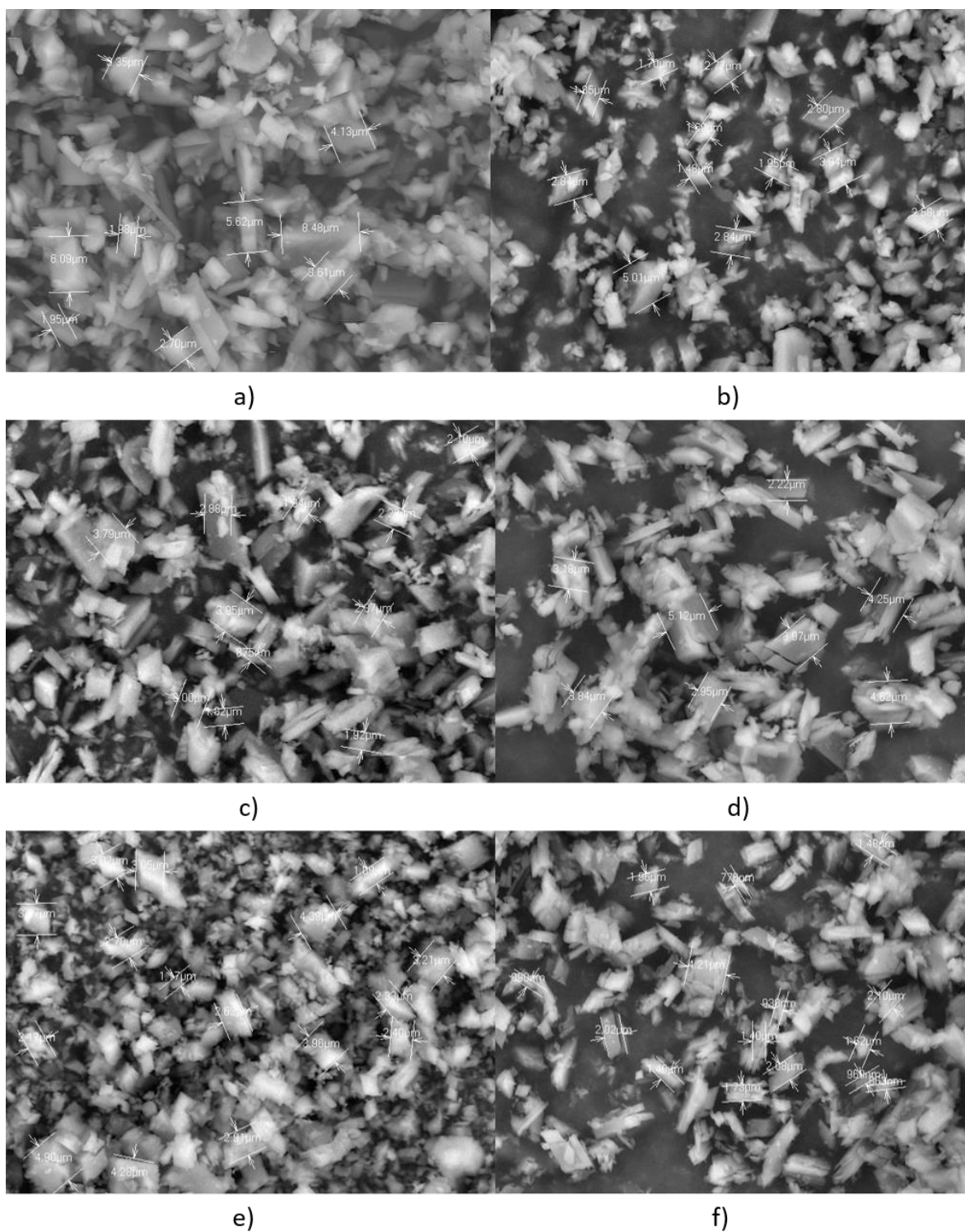
#### Електрон скенирајућа микроскопија

На основу резултата добијених SEM анализом, сам  $\beta$ -CD имао је знатно већи пречник честица у односу на формиране инклузионе комплексе, који се кретао у распону од 4  $\mu\text{m}$  до 20  $\mu\text{m}$  (**Слика 4.24.**), што је потврђено и у осталим литературним подацима (*Guimaraes u sar., 2015; Rakmai u sar., 2018*). Честице  $\beta$ -CD су различитих величина, кристалног, најчешће правоугаоног, облика (*Anaya-Castro u sar., 2017*). Такође, могу се уочити и мале честице присутне на површини кристала, које су уочене и у другим истраживањима (*Songkro u sar., 2012; Anaya-Castro u sar., 2017*).



**Слика 4. 24.** SEM микрографије чистог  $\beta$ -циклодекстрина на различитим увећањима: a) x 200 b) x 500 c) x 1500 d) x 3000

SEM фотографије формираних инклузионих комплекса, различитих односа ЕО: $\beta$ -CD (10:90; 15:85; 20:80), добијених различитим поступцима сушења (лиофилизација и сушница), приказане су на **Слици 4.25.** На датим фотографијама, запажа се да се морфологија честица  $\beta$ -CD потпуно променила након формирања инклузионих комплекса са етарским уљем *S. montana*. Добијени инклузиони комплекси су кристалне структуре, ромбоидног облика, различитих величина и са неправилним и оштрим површинама. Присуство великих кристала указује на то да је дошло до формирања инклузионог комплекса између  $\beta$ -CD и етарског уља *S. montana*, што је у сагласности са литературним наводима (Choi *u cap.*, 2009; Prabu *u cap.*, 2015; Piletti *u cap.*, 2017). Комплекси нису показали видљиве преломе, пукотине или поре, што може да указује на добру и адекватну заштиту етарског уља.



**Слика 4. 25.** SEM микрографије инклузионих комплекса, различитих односа етарско уље:  $\beta$ -циклодекстрин: а) 10:90 с) 15:85 е) 20:80, добијених поступком лиофилизације; односно б) 10:90 д) 15:85 ф) 20:80, добијених поступком сушења у сушници

На основу добијених резултата запажа се да је инклузиони комплекс добијен поступком лиофилизације имао нешто веће пречнике у поређењу са инклузионим комплексима добијеним сушењем у сушници. Посматрајући само инклузионе комплексе добијене сушењем лиофилизацијом, запажа се да је пречник инклузионог комплекса односа ЕО:β-CD=10:90 у просеку највећи (**Слика 4.25.a**), и да се удео честица кретао од 3 μm до 6 μm, поређењем са инклузионим комплексом ЕО:β-CD односа 15:85 (**Слика 4.25.c**) и 20:80 (**Слика 4.25.e**), који се незнатно међусобно разликују. Смањење величине честица довело је до повећања агломерације честица, односно највероватније до повећања влажности честица.

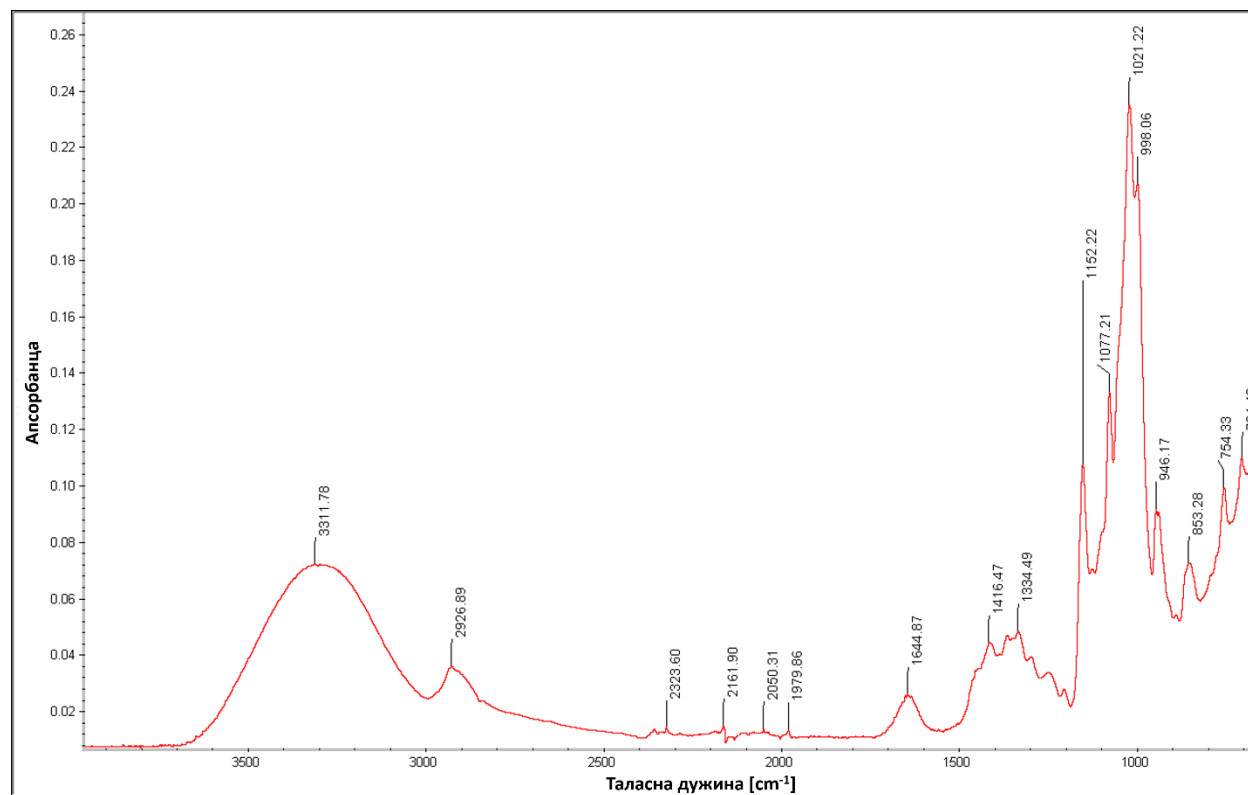
Код честица добијених поступком сушења у сушници није запажена значајна разлика у величини честица, независно од примењеног односа ЕО и β-CD (**Слика 4.25.b,d,f**).

Обзиром да је највећа ефикасност инкапсулације добијена употребом односа ЕО:β-CD - 10:90, може се сматрати да је ефикасност инкапсулације директно сразмерна величини честица, као и да би активност честица највероватније зависила од пречника, који би могли да пруже и већу контактну површину, односно површину за отпуштање инкапсулираних компоненти.

### FTIR спектроскопија

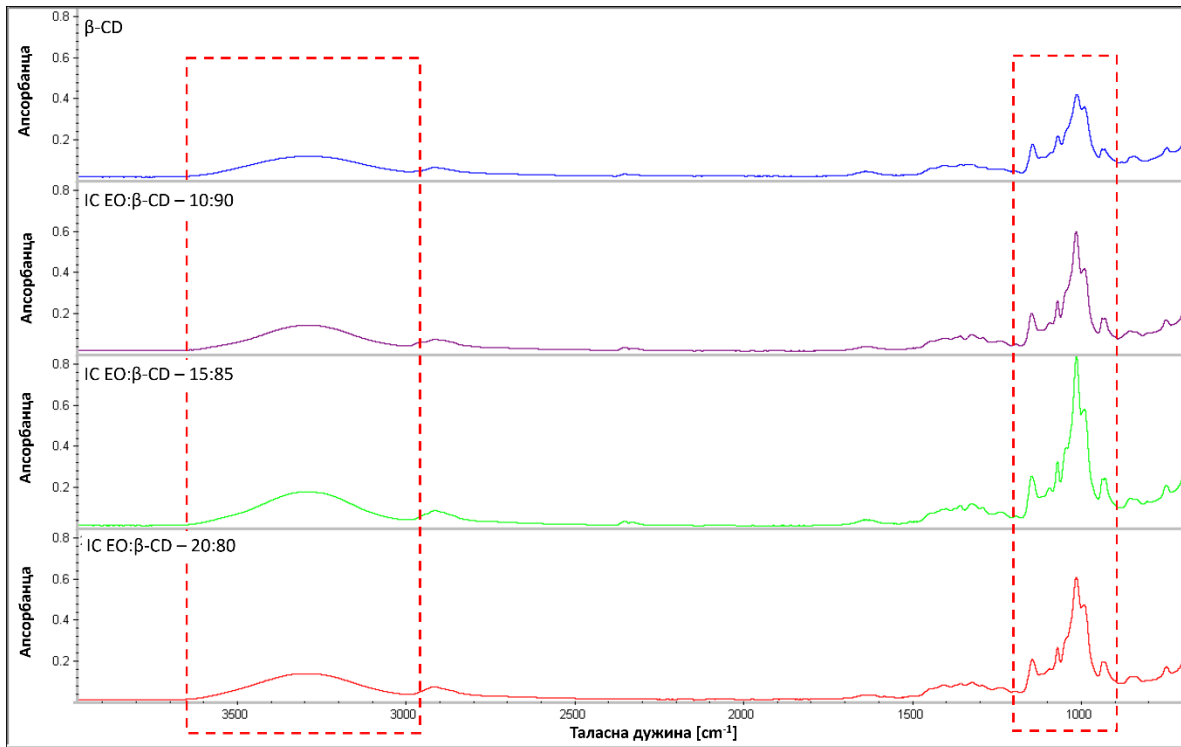
FTIR спектроскопија је примењена за процену интеракције између циклодекстрина и гостујућих молекула, као и за потврђивање присуства специфичних хемијских група у инклузионом комплексу и за процену да ли је поступак инкапсулације утицао на хемијски интегритет било молекула етарског уља или молекула β-циклодекстрина. На овај начин, формирану инклузиони комплекси описани су проучавањем модификације облика, положаја и интензитета пика.

FTIR спектар чистог β-CD дат је на **Слици 4.26.** Веза на 3312 cm<sup>-1</sup> представља вибрацију симетричног и асиметричног истезања –ОН групе, док пик на 2927 cm<sup>-1</sup> је у вези са вибрацијом истезања С–Н везе. Молекули циклодекстрина имају велику количину молекула воде и ОН група у својој структури, што је одговорно за широку траку односно пика на 3400 cm<sup>-1</sup> таласне дужине. Апсорпциона веза на 1645 cm<sup>-1</sup> одговара савијању Н–О–Н веза, док су траке на 1157 cm<sup>-1</sup> и 1029 cm<sup>-1</sup> повезане са вибрацијама асиметричног истезања С–О–С везе, односно симетричног истезања С–О–С везе, редом (*Wang u cap., 2014; Abarca u cap., 2016*).

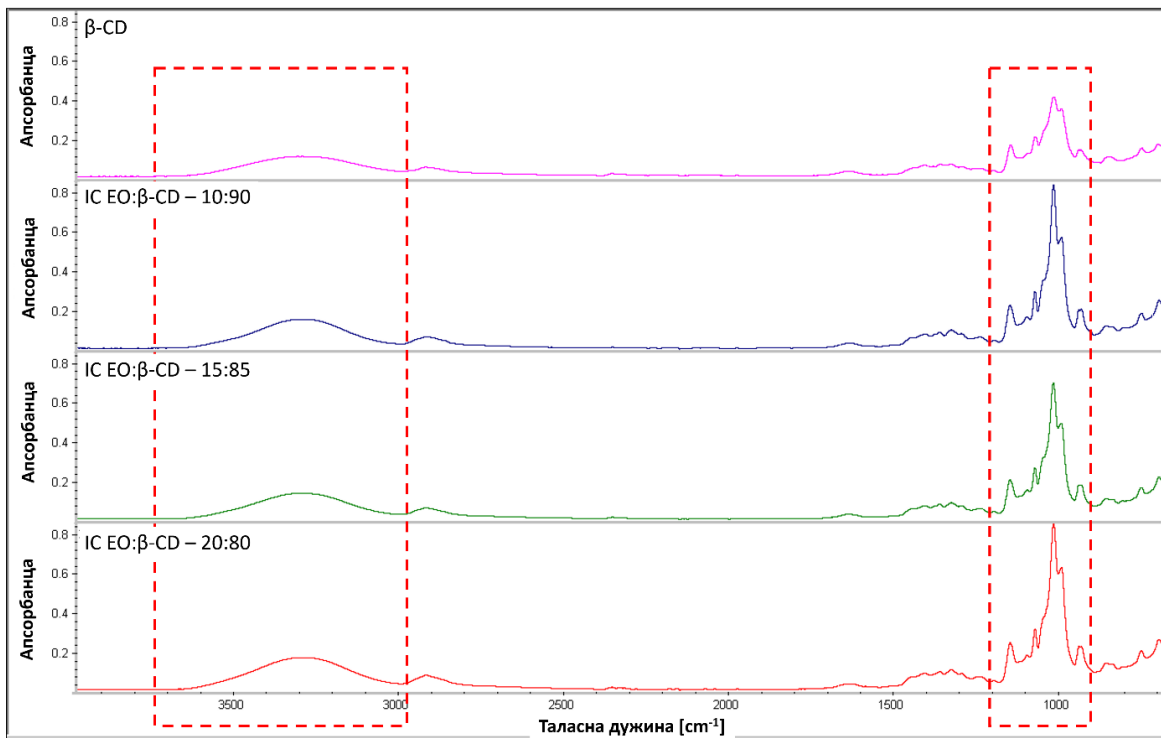


Слика 4. 26. FTIR спектар чистог  $\beta$ -циклодекстрина

FTIR спектри добијених инклузионих комплекса у три различита односа ЕО: $\beta$ -CD = 10:90; 15:85; 20:80, добијени поступком лиофилизације, дати су на **Слици 4.27.**, док су FTIR спектри инклузионих комплекса добијени поступком сушнице представљени на **Слици 4.28.** Код оба поступка сушења, добијени спектри нису показали значајну разлику у поређењу са спектром чистог  $\beta$ -CD. Највеће разлике запажају се у интензитету пика у неким деловима FTIR спектра, као и у благом помаку таласних дужина. Ове промене у карактеристичним тракама, као што су нестајање, ширење и варијације у интензитету пика, резултат су формирања инклузионог комплекса (Kayaci и Uyar, 2011; da Rocha Neto и сар., 2018).



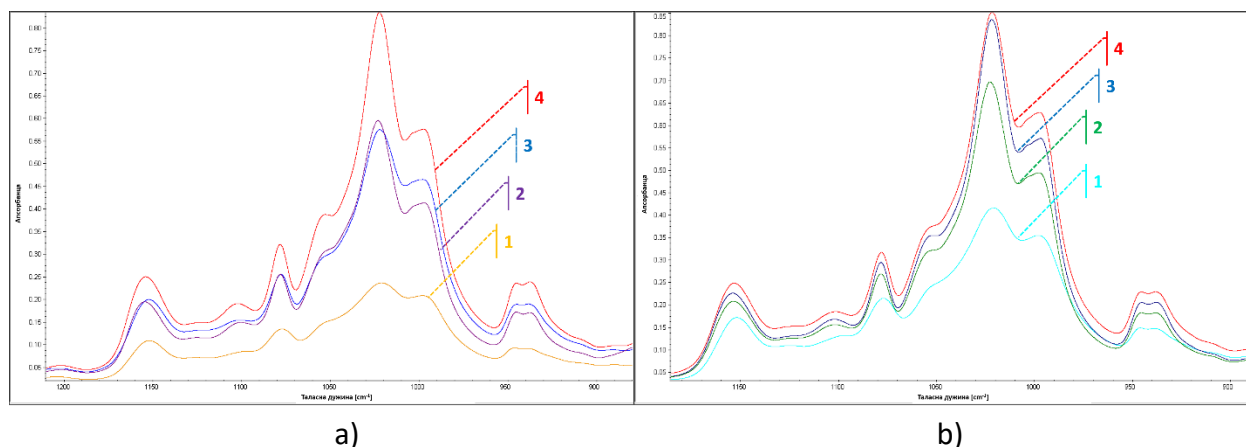
Слика 4. 27. FTIR спектри инклузионих комплекса, сушених у лиофилизатору



Слика 4. 28. FTIR спектри инклузионих комплекса, сушених у сушници



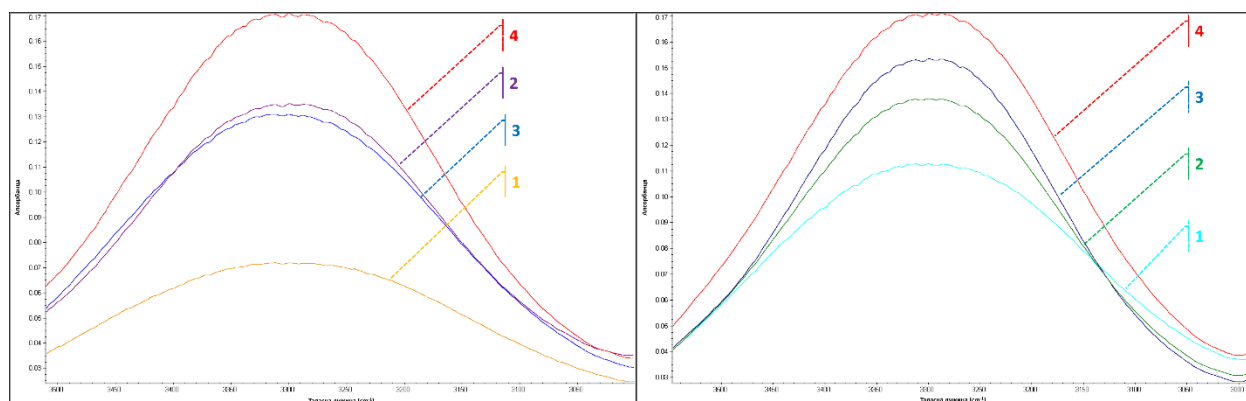
Највеће промене у интензитету пика након формирања инклузионог комплекса запажају се у делу FTIR спектра од 1200 до 900  $\text{cm}^{-1}$  (**Слика 4.29.**), где је са додатком ЕО, односно формирањем инклузионог комплекса дошло до повећања пика у овом делу спектра. Са повећањем концентрације етарског уља у ЕО: $\beta$ -CD односу током формирања инклузионог комплекса, повећава се и апсорбанца пика. Поређењем са спектром чистог етарског уља *S. montana* (**Поглавље 4.1.3.; Слика 4.1.**), запажено је значајно мање добијених пикова, међутим пикови добијени код инклузионих комплекса одговарају пиковима код чистог етарског уља *S. montana* и његових основних компоненти карвакрол и *p*-цимен, са благим помаком таласних дужина, услед насталих интеракција између молекула присутних у етарском уљу и  $\beta$ -CD. Смањење апсорпције пикова као и помаци таласних дужина код насталих инклузионих комплекса у поређењу са чистим етарским уљем, може да указује на претпоставку да су скоро сва једињења етарског уља успешно укључена у шупљину  $\beta$ -CD што је у сагласности са литературним подацима (*da Rocha Neto u sar., 2018; Kayaci u Uyar, 2011*).



**Слика 4. 29.** FTIR спектри инклузионих комплекса у области таласних дужина 1200-900  $\text{cm}^{-1}$ : а) лиофилизација, б) сушница: 1 -  $\beta$ -CD; 2 -EO: $\beta$ -CD-10:90; 3 -EO: $\beta$ -CD-15:85; 4 -EO: $\beta$ -CD-20:80

Повећање пика на 3312  $\text{cm}^{-1}$  таласне дужине са додатком етарског уља, односно формирањем инклузионог комплекса, такође је запажено. Овај пик одговара истезању О–Н везе, а ова појава указује на промену структуре водоничних веза, што је највероватно у вези са реорганизацијом интрамолекуларних водоничних веза формираних између ових О–Н група  $\beta$ -CD у присуству етарског уља. Физичка интеракција између молекула етарског уља и молекула  $\beta$ -CD модификује интеракцију између молекула  $\beta$ -CD и молекула воде или функционалних О–Н група. Нове интеракције имају веће енергетске вредности и указују на значајну структурну модификацију у молекуларној структури  $\beta$ -CD. Повећање овог пика је повезано са истовременим доприносом обе компоненте, ЕО и  $\beta$ -CD које формирају инклузиони комплекс. Ове модификације такође указују на процес инкапсулације између

молекула етарског уља *S. montana* и молекула  $\beta$ -CD, односно да су молекули етарског уља успешно инкапсулирани у хидрофобну шупљину  $\beta$ -CD (Wang *и сар.*, 2011; Piletti *и сар.*, 2017).



**Слика 4. 30.** FTIR спектри инклузионих комплекса у области таласних дужина 3500-3000 *ст-1*: а) лиофилизација, б) сушница: 1 -  $\beta$ -CD; 2 - EO: $\beta$ -CD-10:90; 3 - EO: $\beta$ -CD-15:85; 4 - EO: $\beta$ -CD-20:80

---

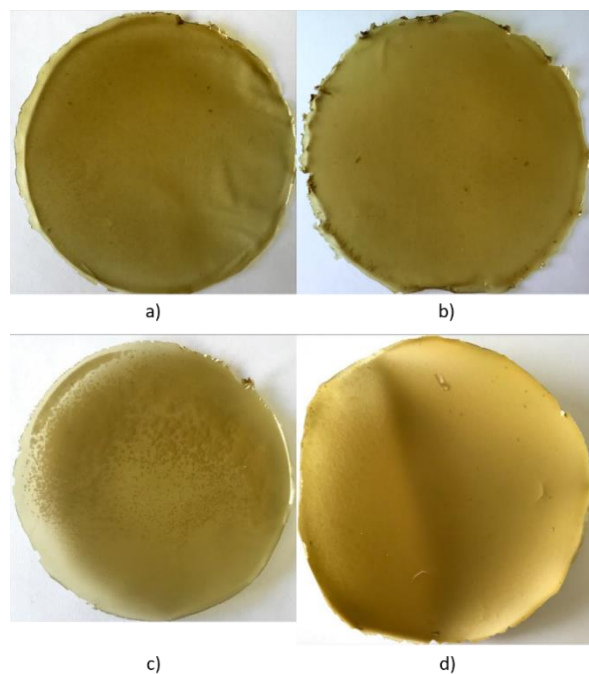
#### 4.4. Карактеризација активних биополимерних филмова на бази погаче уљане тикве голице и инклузионог комплекса

---

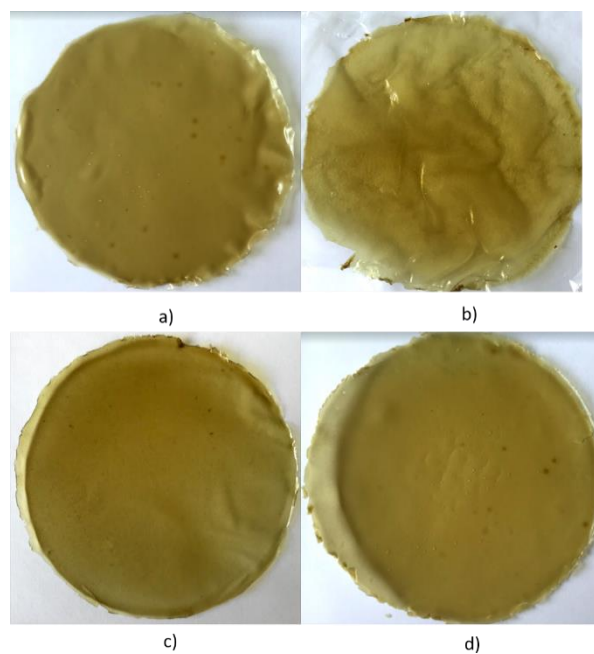
Карактеризација активних биополимерних филмова на бази PuOC и инклузионог комплекса  $\beta$ -циклодекстрин/етарско уље *S. montana* ( $\beta$ -CD/EOsm), у различитим концентрацијама (1 % (m/v) и 2 % (m/v), рачунато на концентрацију етарског уља а преко добијених вредности ефикасности инкапсулације), извршена је одређивањем физичко-механичких, физичко-хемијских, баријерних, структурних особина и антиоксидативне активности добијених филмова. Инклузиони комплекс додат у филмогену суспензију, добијен је поступком сушења у лиофилизатору, односа EO:  $\beta$ -CD (10:90). Ради лакшег поређења утицаја инклузионог комплекса на особине активних филмова на бази PuOC, паралелно су произведени и окарактерисани активни филмови са чистим етарским уљем *S. montana* у истим концентрацијама (1 % (v/v) и 2 % (v/v)). За добијање активних филмова на бази PuOC и етарског уља *S. montana* или инклузионог комплекса коришћене су две различите концентрације глицерола (GLY) (15 % (g/v) и 30 % (g/v)).

Експериментални модел добијања испитиваних активних филмова дат је у **Поглављу 3.5.3.; Табела 3.3.**, док су фотографије филмова са 15 % GLY дате на **Слици 4.31.**, а филмова са 30 % GLY дате на **Слици 4.32.**.

Добијени филмови су били зеленкасте боје, која потиче од супстрата (PuOC). Филмови са додатком инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/EOsm са једне стране, стране која је била у контакту са Петри плочом, имали су слој беличасте боје који потиче од додатог инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/EOsm, посебно филмови са додатком 2 % инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/EOsm (**Слика 4.33.**). Запажен је и значајан утицај додатка  $\beta$ -CD/EOsm на дебљину добијених филмова. Смањење додате концентрације GLY са 30 % на 15 % је значајно утицало на физичке особине добијених материјала са инклузионим комплексом. Филмови са мање GLY (15 %) су били кртији и ломљивији. Смањен интезитет ароме етарског уља код филмова са  $\beta$ -CD/EOsm у поређењу са филмовима са самим етарским уљем је такође запажен, што се може приписати деловању  $\beta$ -CD као инкапсулационог агенса, и успешном инкапсулирању етарског уља и формирању инклузионог комплекса, услед чега је дошло до смањења јаке ароме етарског уља.



**Слика 4. 31.** Активни биополимерни филмови на бази  $PuOC$  са 15 %  $GLY$  и : a) 1 %, b) 2 % етарским уљем *S. montana*; c) 1 %, d) 2 % инклузионог комплекса



**Слика 4. 32.** Активни биополимерни филмови на бази  $PuOC$  са 30 %  $GLY$  и : a) 1 %, b) 2 % етарским уљем *S. montana*; c) 1 %, d) 2 % инклузионог комплекса



**Слика 4. 33.** Активни биополимерни филм на бази  $PuOC$  са 30 %  $GLY$  и 2 % инклузионог комплекса

#### 4.4.1. Физичко-механичке особине

**Дебљина** активних филмова на бази  $PuOC$  са различитим концентрацијама (1 % и 2 %) етарског уља *S. montana* или са различитим концентрацијама (1 % и 2 %) инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/ $EOsm$ , дате су у **Табели 4.13.** На основу добијених резултата запажа се утицај додатка  $EO$  и  $GLY$ , као и значајан утицај додатка  $\beta$ -CD/ $EOsm$  у биополимерне филмове на бази  $PuOC$ . Филмови са већом концентрацијом  $GLY$  (30 %) имали су и већу дебљину, у поређењу са филмовима са 15 %  $GLY$ . Додатак  $\beta$ -CD/ $EOsm$  је значајно повећао дебљину контролног филма за 89 %, од 102,07  $\mu m$  (контрола) до 193,27  $\mu m$  (филм са 1%  $\beta$ -CD/ $EOsm$ ), и чак за 174 %, од 102,07  $\mu m$  (контрола) до 280,03  $\mu m$  (филм са 2%  $\beta$ -CD/ $EOsm$ ), код филмова са мањом концентрацијом  $GLY$  (15 %) ( $p < 0,05$ ). У случају филмова са већом концентрацијом  $GLY$  (30 %), такође је запажено значајно повећање дебљине филмова, за 64 %, од 117,88  $\mu m$  (контрола) до 192,85  $\mu m$  (филм са 1%  $\beta$ -CD/ $EOsm$ ) и за више од 130 % са додатком 2 %  $\beta$ -CD/ $EOsm$  ( $p < 0,05$ ).

Као што је већ споменуто, дебљина биополимерних филмова расте са повећањем броја растворених компоненти, што се приписује повећању садржаја чврсте супстанце, па је са тим у вези логично да ће додатак различитих компоненти, а посебно инклузионих комплекса који се налази у чврстом, прашкастом стању, значајно утицати на повећање дебљине филмова.

**Затезна јачина (TS) и издужење при кидању (EAB)** активних филмова на бази  $PuOC$  са различитим концентрацијама (1 % и 2 %) етарског уља *S. montana* или са различитим

концентрацијама (1 % и 2 %) инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/EOsm, дати су у **Табели 4.13.** Повећање концентрације GLY са 15 % на 30 % је, значајно утицало на механичка својства биополимерних филмова, где је запажено значајно смањење TS и повећање EAB вредности ( $p < 0,05$ ). Глицерол је један од најчешће коришћених пластификатора код синтезе биополимерних филмова. Делује тако што смањује међуланчане реакције и кохезију, што утиче на то да добијени материјали буду мање крти, и флексибилнији (*Higuera et al., 2013*).

**Табела 4. 13.** Физичко-механичке особине активних биополимерних филмова на бази *PuOS* и етарског уља *S. montana* или инклузионог комплекса

GLY (g/v), %	Узорци	Дебљина, $\mu\text{m}$	Затезна јачина, МПа	Издужење при кидану, %
15	контрола	102,07 $\pm$ 14,19 <sup>ab</sup>	1,36 $\pm$ 0,39 <sup>bc</sup>	50,97 $\pm$ 12,64 <sup>b</sup>
	<b>EO, % (v/v)</b>		<b>етарско уље <i>S. montana</i></b>	
	1	97,57 $\pm$ 6,74 <sup>ab</sup>	1,79 $\pm$ 0,17 <sup>c</sup>	75,45 $\pm$ 21,22 <sup>bc</sup>
	2	79,31 $\pm$ 5,15 <sup>a</sup>	1,17 $\pm$ 0,05 <sup>ab</sup>	75,48 $\pm$ 6,36 <sup>bc</sup>
	<b><math>\beta</math>-CD/EOsm, % (m/v)</b>		<b>инклузиони комплекс <math>\beta</math>-CD/EOsm</b>	
	1	193,27 $\pm$ 30,62 <sup>d</sup>	3,03 $\pm$ 0,44 <sup>d</sup>	2,60 $\pm$ 0,56 <sup>a</sup>
2	280,03 $\pm$ 13,12 <sup>e</sup>	2,73 $\pm$ 0,25 <sup>d</sup>	2,58 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>	
30	контрола	117,88 $\pm$ 4,2 <sup>bc</sup>	0,66 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	87,26 $\pm$ 7,29 <sup>bcd</sup>
	<b>EO, % (v/v)</b>		<b>етарско уље <i>S. montana</i></b>	
	1	122,26 $\pm$ 6,24 <sup>bc</sup>	0,68 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	113,01 $\pm$ 15,55 <sup>d</sup>
	2	138,6 $\pm$ 1,5 <sup>c</sup>	0,57 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	88,80 $\pm$ 25,33 <sup>cd</sup>
	<b><math>\beta</math>-CD/EOsm, % (m/v)</b>		<b>инклузиони комплекс <math>\beta</math>-CD/EOsm</b>	
	1	192,85 $\pm$ 11,18 <sup>d</sup>	1,02 $\pm$ 0,06 <sup>ab</sup>	16,35 $\pm$ 2,05 <sup>e</sup>
2	279,07 $\pm$ 15,25 <sup>e</sup>	0,89 $\pm$ 0,19 <sup>ab</sup>	2,64 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>	

\* Различита слова указују на значајне разлике међу узорцима у колонама ( $p < 0,05$ )

Додатак инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/EOsm у биополимерне филмове на бази *PuOS*, је довело до значајног повећања TS вредности ( $p < 0,05$ ). До сличних запажања дошли су и *Chen et al. (2019)*, након инкорпорирања цитрала и *транс*-цинамалдехида, као и инклузионог комплекса на бази  $\beta$ -CD и поменутих једињења, у EVOH (етилен винил алкохол) филмове. *Wu et al. (2014)* и *Ye et al. (2017)* су такође запазили повећање TS филма на бази желатина након додатка ниже концентрације инклузионог комплекса  $\beta$ -CD. Међутим, са повећањем концентрације додатог инклузионог комплекса у желатинске филмове, вредности TS су се смањиле, указујући на ефекат концентрације инклузионог комплекса на TS филмова. Ови добијени резултати указују на слабљење постојећих веза у биополимерним филмовима, перколацијом  $\beta$ -CD инклузионог комплекса у матрицу филма и успостављањем нових интермолекуларних веза (електростатичке силе, водонична веза и

ван дер Валсове силе) између молекула  $PuOC$  филма и инклузионог комплекса, што је потврђено FTIR анализом. Ове нове настале везе, највероватније смањују молекуларну покретљивост и слободну запремину филма (*Sun u cap.*, 2014), ојачавају мрежну структуру, утичући тако на механичка својства, односно затезну јачину, филма на бази  $PuOC$  (*Adel u cap.*, 2019; *Sun u cap.*, 2014; *Ye u cap.*, 2017).

Додатак етарског уља у филмове на бази  $PuOC$  повећало је ЕАВ вредности, док је додатак  $\beta$ -CD/ $EOsm$  довео до значајног смањења, чак за више од 80 %, код филмова са 15 % GLY, и за више од 95 %, код филмова са 30 % GLY. Слична запажања су потврђена и у другим истраживањима, након додатак различитих концентрација (од 0,25 % до 75 %) инклузионих комплекса на бази  $\beta$ -CD у хитозанске филмове (*Higuera u cap.*, 2013; *Sun u cap.*, 2014; *Adel u cap.*, 2019) и желатинске филмове (*Li u cap.*, 2018; *Wu u cap.*, 2018). Према *Sun u cap.* (2014), који су анализирали својства хитозанских филмова са инклузионим комплексом  $\beta$ -CD, инклузиони комплекс је деловао као пунило за матрицу филма, а његов додатак резултирао је снажном реакцијом пунила и матрице, смањујући деформацију филмова, односно ЕАВ вредности, ограничавањем кретања матрице. Механичке особине биополимерних филмова обично су повезане са микроструктуром филмске мреже и интермолекуларним силама. Расподела и концентрација међу- и унутар-молекуларних интеракција веома су важни за механичка својства филмова на бази протеина. Равномернија расподела и мање честице инклузионог комплекса могу учинити да су мрежне структуре филмова нетакнутије, што резултира бољим механичким својствима филмова. Веће честице инклузионог комплекса уграђене у биополимерне филмове чешће заузимају већу количину простора и веће растојање између молекула филмова, што доводи до делимичног оштећења првобитне структуре филмова, што би могло значити мању интеракцију молекула. Мање честице инклузионог комплекса чине хомогенију структуру, па би могле имати и боља механичка својства (*Wu u cap.*, 2018).

#### 4.4.2. Физичко-хемијске особине

**Садржај влаге (MC), укупна растворљивост (TSM) и бубрење** активних филмова на бази  $PuOC$  са различитим концентрацијама (1 % и 2 %) етарског уља *S. montana* или са различитим концентрацијама (1 % и 2 %) инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/ $EOsm$ , дати су у **Табели 4.14.**

Концентрација додатог GLY показала је значајан утицај на MC филмова на бази  $PuOC$  ( $p < 0,05$ ). Филмови са мањом концентрацијом GLY (15 %) су имали чак до 38 % (контрола и филм са 1 %  $\beta$ -CD/ $EOsm$ ), и до 28 % (филмови са 1 % EO, 2 % EO и 2 %  $\beta$ -CD/ $EOsm$ ) мање вредности MC, у поређењу са филмовима са 30 % GLY. *Higuera u cap.* (2013) су показали да

хитозански филмови са HP- $\beta$ -CD (хидроксипропил -  $\beta$ - CD) инклузионим комплексом и GLY су имали значајно веће вредности MC у поређењу са филмовима без GLY, сугеришући да је GLY била компонента са највећим уносом воде. Након додатка етарског уља, у обе концентрације (1 % и 2 %), мало повећање вредности MC је добијено код филмова са 15 % GLY, док је смањење забележено код филмова са 30 % GLY ( $p > 0,05$ ). Додатак  $\beta$ -CD/*EOsm* довео је до значајног смањења вредности MC код филмова ( $p < 0,05$ ), за приближно  $60 \pm 5$  %, код обе концентрације GLY, без значајног утицаја додате концентрације инклузионог комплекса ( $p > 0,05$ ). Смањење вредности MC филмова на бази биополимера са додатком ЕО последица је њихове хидрофобне природе, јер доводе до мање апсорпције воде матрикса филма. Ова појава може указати на повећану растворљивост етарског уља *S. montana* у биополимерне филмове на бази  $PuOC$ , након формирања инклузионог комплекса са  $\beta$ -CD што је и управо једна од поменутих и значајних карактеристика и примене  $\beta$ -CD као инкапсулационог агенса. *Ye и сар. (2017)* су такође уочили значајно смањење MC биополимерних филмова на бази желатина са додатком више концентрације  $\beta$ -CD инклузионог комплекса, сугеришући да је дошло до интеракције инклузионог комплекса и молекула желатина путем водоничне везе, што је утицало на смањење доступних хидроксилних група које утичу на MC филмова.

**Табела 4. 14.** Физичко-хемијске особине активних биополимерних филмова на бази  $PuOC$  и етарског уља *S. montana* или инклузионог комплекса

GLY (g/v), %	Узорци	Садржај влаге, %	Укупна растворљивост, %	Бубрење, %
15	контрола	$17,56 \pm 2,39^c$	$45,17 \pm 1,68^c$	$117,29 \pm 6,62^f$
	<b>ЕО, % (v/v)</b>		<b>етарско уље <i>S. montana</i></b>	
	1	$18,88 \pm 2,07^c$	$40,33 \pm 2,78^{bc}$	$86,18 \pm 10,05^d$
	2	$18,74 \pm 1,87^c$	$41,97 \pm 3,16^{bc}$	$83,19 \pm 12,32^d$
	<b><math>\beta</math>-CD/<i>EOsm</i>, % (m/v)</b>		<b>инклузиони комплекс <math>\beta</math>-CD/<i>EOsm</i></b>	
	1	$7,96 \pm 0,47^a$	$56,95 \pm 1,89^d$	$30,58 \pm 7,24^{ab}$
2	$7,06 \pm 0,75^a$	$46,79 \pm 3,43^c$	$41,97 \pm 2,51^{bc}$	
30	контрола	$28,40 \pm 0,59^d$	$31,98 \pm 2,07^a$	$113,71 \pm 17,17^{ef}$
	<b>ЕО, % (v/v)</b>		<b>етарско уље <i>S. montana</i></b>	
	1	$26,26 \pm 1,06^d$	$39,77 \pm 1,03^{bc}$	$91,44 \pm 8,72^{de}$
	2	$26,30 \pm 1,38^d$	$35,88 \pm 3,57^{ab}$	$53,83 \pm 3,02^c$
	<b><math>\beta</math>-CD/<i>EOsm</i>, % (m/v)</b>		<b>инклузиони комплекс <math>\beta</math>-CD/<i>EOsm</i></b>	
	1	$12,97 \pm 1,08^b$	$56,52 \pm 1,43^d$	$12,45 \pm 0,75^a$
2	$10,03 \pm 1,11^{ab}$	$59,86 \pm 1,93^d$	$17,28 \pm 0,49^a$	

\* Различита слова указују на значајне разлике међу узорцима у колонама ( $p < 0,05$ )



Добијени резултати показују да додатак различите концентрације GLY је имао највећи утицај на укупну растворљивост филмова на бази PuOC, где је дошло до значајног смањења вредности TSM са повећањем концентрације GLY са 15 % на 30 % ( $p < 0,05$ ). Додатак етарског уља није показао значајан утицај на растворљивост филмова, док је додаток инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/EOsm значајно повећао TSM вредности PuOC филмова. Многа истраживања су потврдила повећање растворљивости различитих биополимерних филмова након додатка  $\beta$ -CD инклузионог комплекса (*Wu и сар., 2018*). На основу *Ye и сар. (2017)* TSM вредности филмова на бази желатина постају веће са повећањем садржаја инклузионог комплекса. Као што је већ поменуто,  $\beta$ -CD поседује хидрофобну шупљину која омогућава заробљавање хидрофобних компоненти приликом формирања инклузионог комплекса, и на овај начин може утицати на побољшање растворљивости и биокompatбилности различитих хидрофобних компоненти (*Wu и сар., 2018*) што је још једна од значајних карактеристика  $\beta$ -CD као инкапсулационог агенса. Главне интеракције које се стварају између инклузионог комплекса, глицерола и матрикса филма су слабе водоничне везе (*Martucci и Ruseckaite, 2010*). Инклузиони комплекс интерагује са молекулима филма водоничним везама које се лако замењују молекулима воде, што доводи до ексудације инклузионог комплекса и повећању вредности TSM.

Највећи утицај додатка етарског уља и  $\beta$ -CD/EOsm на физичко-хемијске особине биополимерних филмова на бази PuOC, је забележен код својства бубрења филмова. Смањење вредности бубрења контролног филма је било и до 89 % након додатка 1 %  $\beta$ -CD/EOsm, код филмова са 30 % GLY.

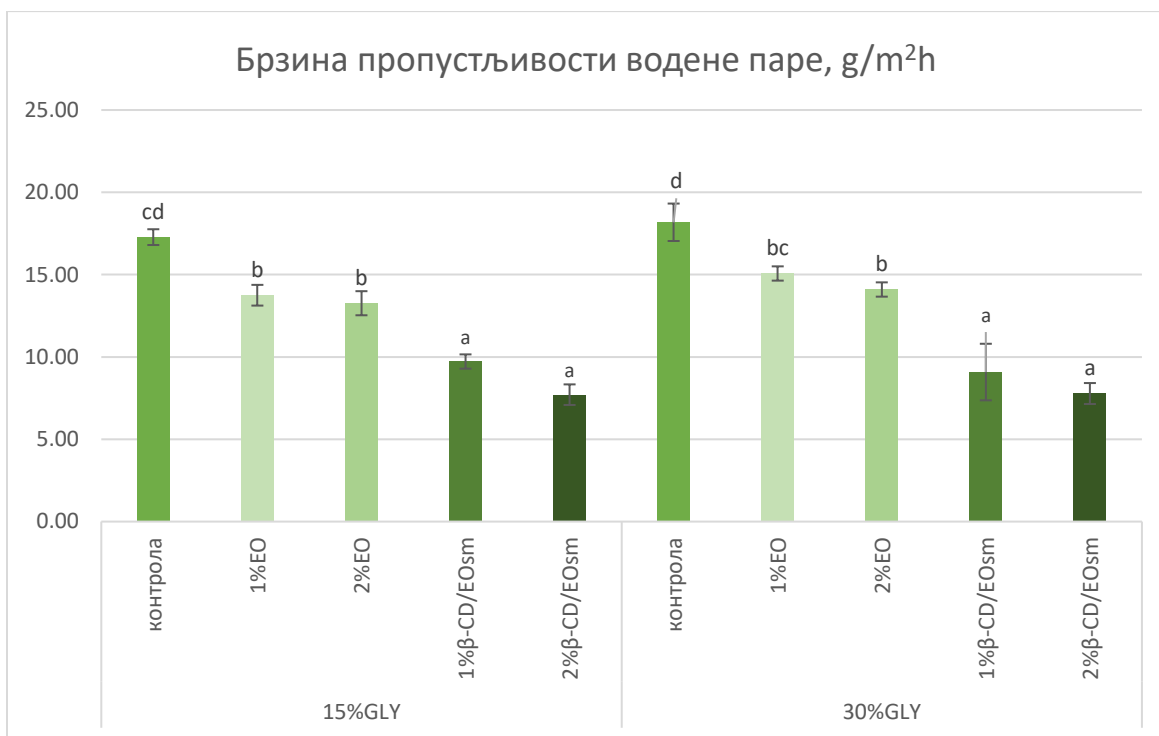
На основу добијених резултата, може се закључити да укључивање хидрофобних етарских уља и  $\beta$ -CD/EOsm у филмове на бази биополимера могло би повећати површинску хидрофобност филмова, смањујући на тај начин афинитет филмова према води.

#### 4.4.3. Баријерне особине

**Брзина пропустљивости водене паре (WVTR)** активних филмова на бази PuOC са различитим концентрацијама (1 % и 2 %) етарског уља *S. montana* или са различитим концентрацијама (1 % и 2 %) инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/EOsm, дата је **Слици 4.34**.

Значајан утицај различите концентрације GLY на WVTR није запажен ( $p > 0,05$ ), док је додаток инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/EOsm смањио WVTR контролног филма са 15 % GLY и до 55,42 %, односно и до 57,21 % код контролног филма са 30 % GLY, са додатком 2 %  $\beta$ -CD/EOsm. Интеракције које настају између  $\beta$ -CD и полимера могу створити стеричке сметње и смањити покретљивост сегмената, ограничавајући дифузију кроз полимерни матрикс (*Higuera и сар., 2013*). Поред тога, према *Higuera и сар. (2013)* додаток  $\beta$ -CD у

биополимерне филмове може утицати на смањење апсорпције воде полимерног матрикса, па се може очекивати и смањење дифузије, односно вредности пропусљивости водене паре биополимерних филмова.



**Слика 4. 34.** Брзина пропусљивости водене паре активних биополимерних филмова на бази PuOC, са 15 % или 30 % GLY и етарског уља *S. montana* или инклузионог комплекса, у различитим концентрацијама (1 % и 2 %). Различита слова указују на значајне разлике међу узорцима ( $p < 0,05$ ).

Смањење пропусљивости водене паре биополимерних филмова са додатком инклузионог комплекса на бази β-CD, запажено је и у другим литературним подацима (Higuera *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2014; Adel *et al.*, 2019). Код механичких особина (Поглавље 4.4.1.) закључено је да додаток инклузионог комплекса β-CD/EOsm делује као пунило у матриксу филма, смањујући деформацију филмова, односно стварајући антипластификујући ефекат. У случају утицаја β-CD на WVTR, сматра се да настали инклузиони комплекс као пунило пружа изврсно баријерно својство према воденој пари јер формира велики број водоничних веза са матриксом филма, и спречавања дифузију молекула воде кроз филмове, смањујући вредности пропусљивости водене паре (Sun *et al.*, 2014).

**Пропустљивост (трансмисија) светлости** активних филмова на бази PuOC са различитим концентрацијама (1 % и 2 %) етарског уља *S. montana* или са различитим концентрацијама (1 % и 2 %) инклузионог комплекса β-CD/EOsm, дате су на **Слици 4.35.**, за

филмове са 15 % GLY, и **Слици 4.36.** за филмове са 30 % GLY, изражена у виду трансмисије светлости (%).

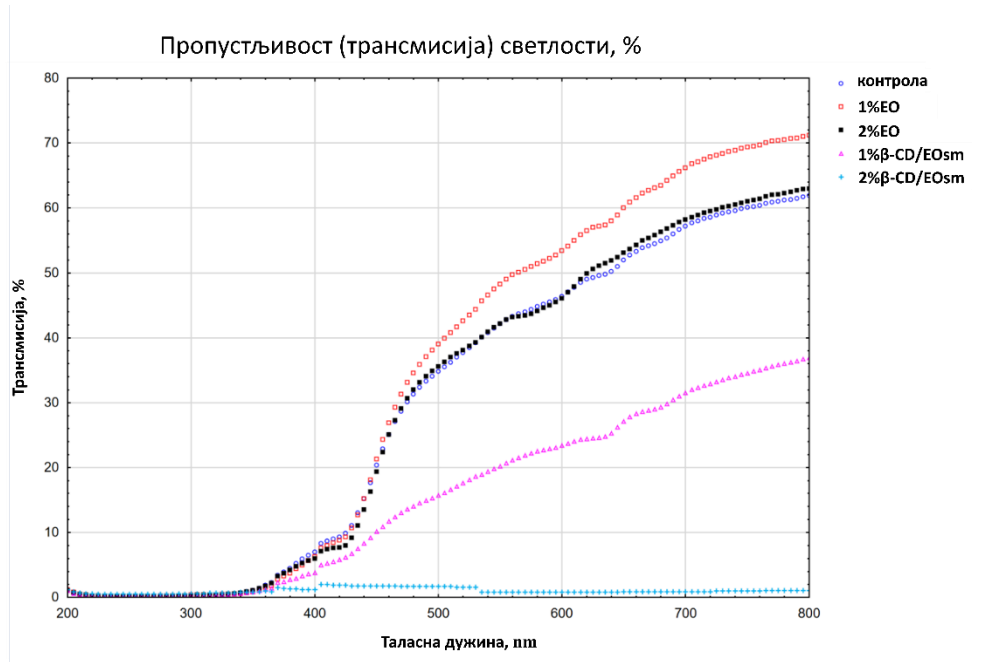
На основу добијених резултата, сви биополимерни материјали имали су трансмисију светлости нижу од 1 % у таласним дужинама од 280 nm до 200 nm, подручје типично за UV зрачење.

У опсегу видљивог дела светлости (300 - 800 nm), са порастом таласне дужине, трансмисија преноса видљивог дела светлости филмова постепено се повећавала. Виша концентрација GLY (30 %) дала је филмове са нижом трансмисијом светлости. На 800 nm контролни филм са 15 % GLY имао је трансмисију светлости од 61,9 %, док је контролни филм са 30 % GLY имао трансмисију светлости од 58,4 %. Ипак, највећа редукција трансмисије запажа се код биополимерних филмовима са додатком инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/EOsm. Смањење трансмисије код филмова са 1 % инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/EOsm, износило је 85 % након повећања концентрације додатог GLY са 15 % на 30 %. Трансмисија је редукована са 36,9 % (филм са 1 %  $\beta$ -CD/EOsm, 15 % GLY) на 5,5 % (филм са 1 %  $\beta$ -CD/EOsm, 30 % GLY). Још веће смањење, од 54,5 %, је запажено након додатка 2 % инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/EOsm. Са 1,1 % (филм са 2 %  $\beta$ -CD/EOsm, 15 % GLY) на 0,5 % (филм са 2 %  $\beta$ -CD/EOsm, 30 % GLY).

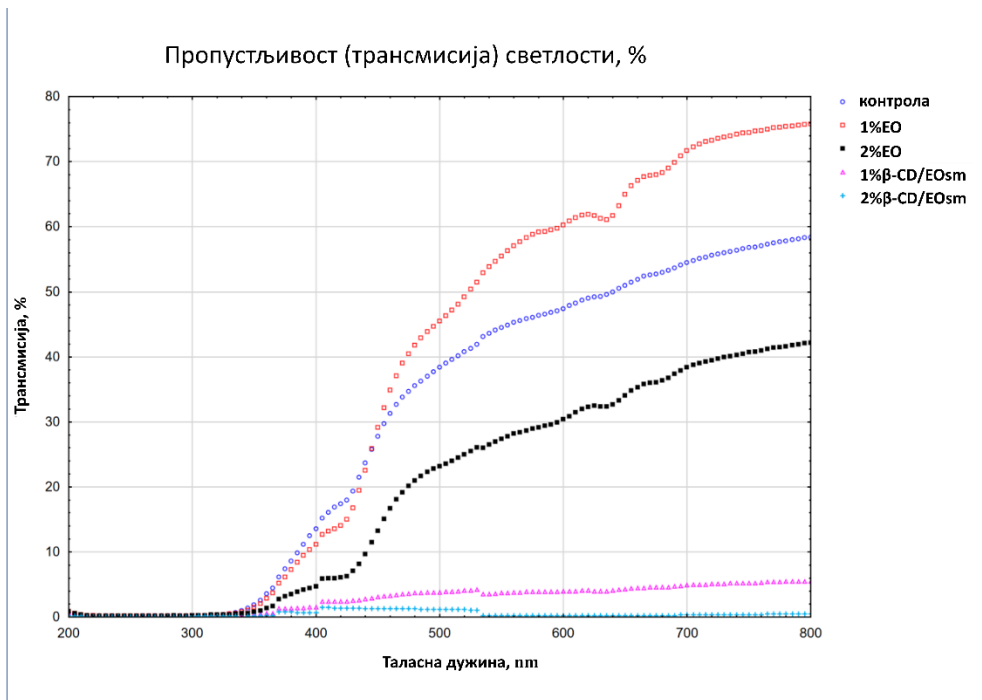
Додатком инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/EOsm у филмове на бази PuOC значајно је смањена трансмисија светлости контролног филма. Код филмова са 15 % GLY, на таласној дужини од 800 nm, након додавања 1 %  $\beta$ -CD/EOsm, дошло је до редукције трансмисије за 40 %, са 61,9 % (контрола, 15 % GLY) на 36,9 % (1 %  $\beta$ -CD/EOsm, 15 % GLY). Док је након додатка 2 %  $\beta$ -CD/EOsm, смањење трансмисије било чак 98 %, са 61,9 % (контрола, 15 % GLY) на 1,1 % (2 %  $\beta$ -CD/EOsm, 15 % GLY).

Код филмова са 30 % GLY, на таласној дужини од 800 nm, након додавања  $\beta$ -CD/EOsm, запажена је још већа редукција трансмисије светлости, где је након додатка 1 %  $\beta$ -CD/EOsm, смањење трансмисије било 91 %, са 58,4 % (контрола, 30 % GLY) на 5,5 % (1 %  $\beta$ -CD/EOsm, 30 % GLY), и чак 98 % након додатка 2 %  $\beta$ -CD/EOsm, са 58,4 % (контрола, 30 % GLY) на 0,5 % (2 %  $\beta$ -CD/EOsm, 30 % GLY).

Смањење трансмисије светлости код биополимерних филмова са додатком инклузионог комплекса може бити резултат повећања дебљине филма.



**Слика 4. 35.** Пропустљивост светлости активних биополимерних филмова на бази РиОС са 15%GLY, и етарског уља *S. montana* или инклузионог комплекса, у различитим концентрацијама (1 % и 2 %)



**Слика 4. 36.** Пропустљивост светлости активних биополимерних филмова на бази РиОС са 30%GLY, и етарског уља *S. montana* или инклузионог комплекса, у различитим концентрацијама (1 % и 2 %)

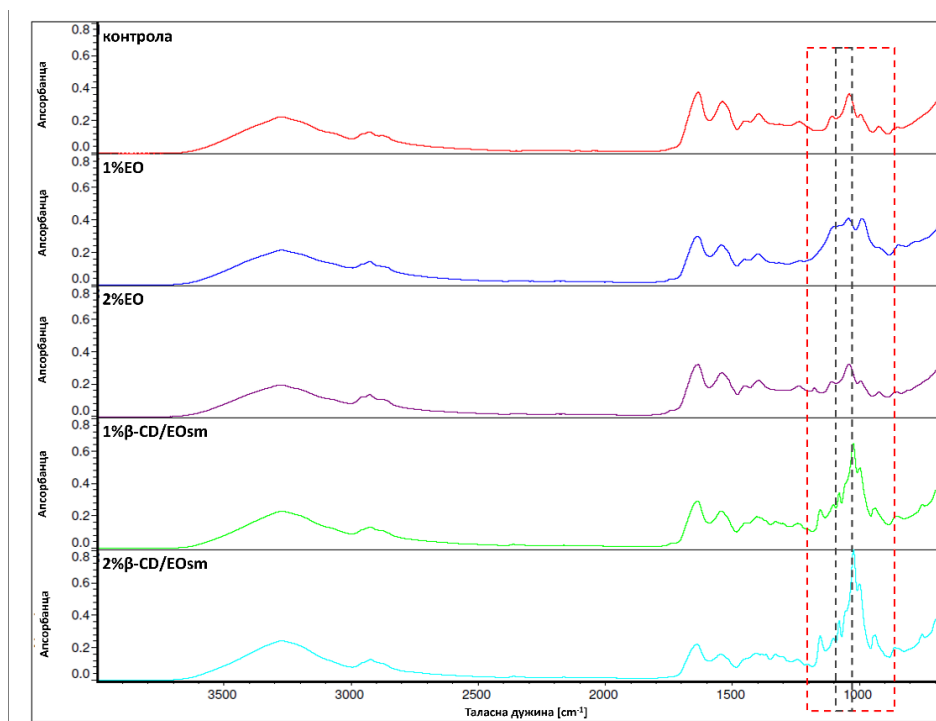
#### 4.4.4. Структурне особине

**FTIR спектри** активних филмова на бази  $PuOC$  са различитим концентрацијама (1 % и 2 %) етарског уља *S. montana* или са различитим концентрацијама (1 % и 2 %) инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/*EOsm*, дате су на **Слици 4.37.**, за филмове са 15 % GLY, и **Слици 4.38.** за филмове са 30 % GLY.

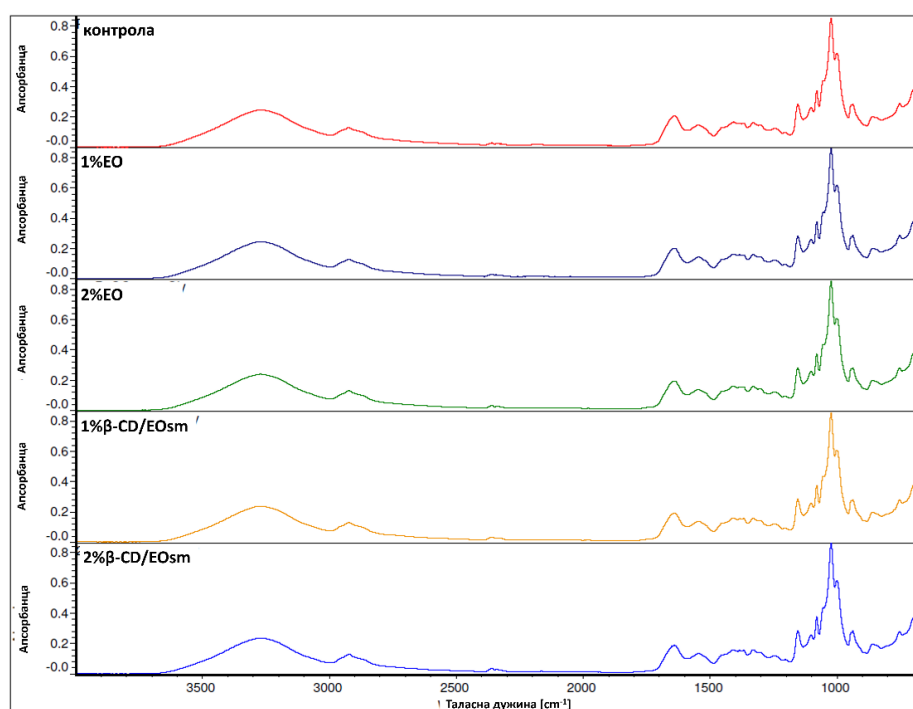
Добијени спектри одговарају FTIR спектру самог инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/*EOsm* (**Поглавље 4.3.2.; Слика 4.27**), односно чистог  $\beta$ -CD (**Поглавље 4.3.2.; Слика 4.26**). Једине разлике запажају се у апсорбанцама добијених карактеристичних пикова и благом померању таласних дужина добијених пикова.

Поређењем добијених спектра филмова на бази  $PuOC$  са 15 % GLY и филмова на бази  $PuOC$  са 30 % GLY, највећа разлика запажа се у амплитуди пика на таласној дужини дела спектра од 1100 до 900  $cm^{-1}$ . На основу литературних података овај део спектра одговара ОН групи из глицерола. Нижа амплитуда пика код филмова са 15 % GLY у поређењу са филмовима са 30 % GLY одговара садржају глицерола у филму. Са додатком 1 % и 2 % етарског уља у филм на бази  $PuOC$  дошло је до редукције овог пика услед дилуционог ефекта изазваног додатком етарског уља.

Смањење амплитуде пика у делу спектра 3500-3000  $cm^{-1}$  са додатком ЕО је запажено, што је у сагласности са резултатима датим у **Поглављу 4.2.4.; Слика 4.15.** Међутим, са додатком  $\beta$ -CD/*EOsm*, запажено је повећање апсорбанце пика овог дела спектра, које је веће са повећањем концентрације додатог инклузионог комплекса. Ова појава била је више карактеристична за филмове са 15 % GLY (**Слика 4.39.**). До сличних запажања дошли су и *Adel и сар. (2019)* након инкорпорирања инклузионог комплекса на бази  $\beta$ -CD у хитозански филм, сугеришући да је до повећања апсорбанце пика дошло услед мреже насталих водоничних веза које се формирају између –ОН доступних веза инклузионог молекула  $\beta$ -CD и –NH<sub>2</sub> доступних веза у молекулу хитозана.

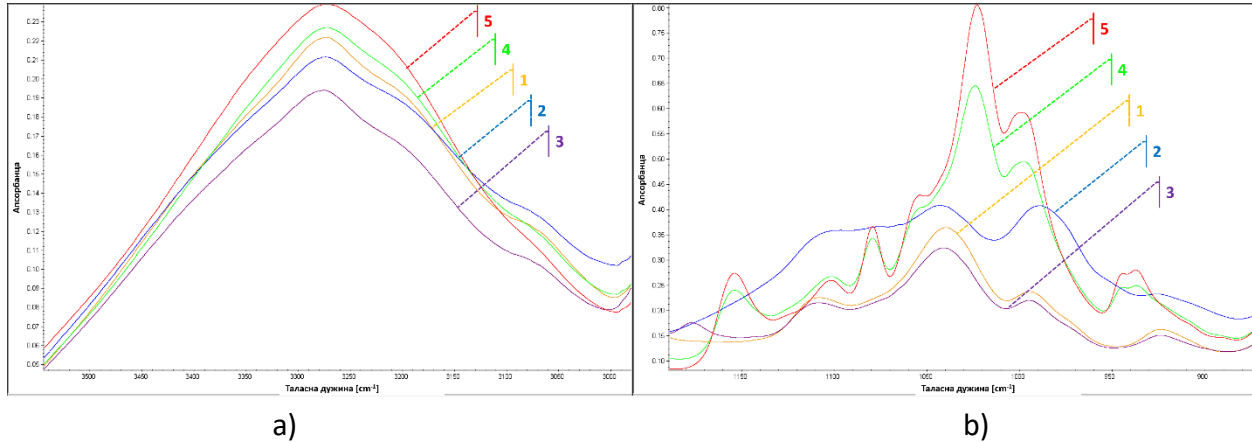


**Слика 4. 37.** FTIR спектри активних биополимерних филмова на бази Р<sub>и</sub>ОС са 15%GLY, и етарског уља *S. montana* или инклузионог комплекса, у различитим концентрацијама (1 % и 2 %)



**Слика 4. 38.** FTIR спектри активних биополимерних филмова на бази Р<sub>и</sub>ОС са 30%GLY, и етарског уља *S. montana* или инклузионог комплекса, у различитим концентрацијама (1 % и 2 %)

Повећање пика у делу FTIR спектра од  $1200$  до  $900\text{ cm}^{-1}$ , код филмова са  $15\%$  GLY (Слика 4.39.), са додатком  $\beta$ -CD/EOsm је, такође, запажено, што је у сагласности са резултатима добијеним за FTIR спектре самог  $\beta$ -CD/EOsm инклузионог комплекса, датим у Поглављу 4.3.2.; Слика 4.27.



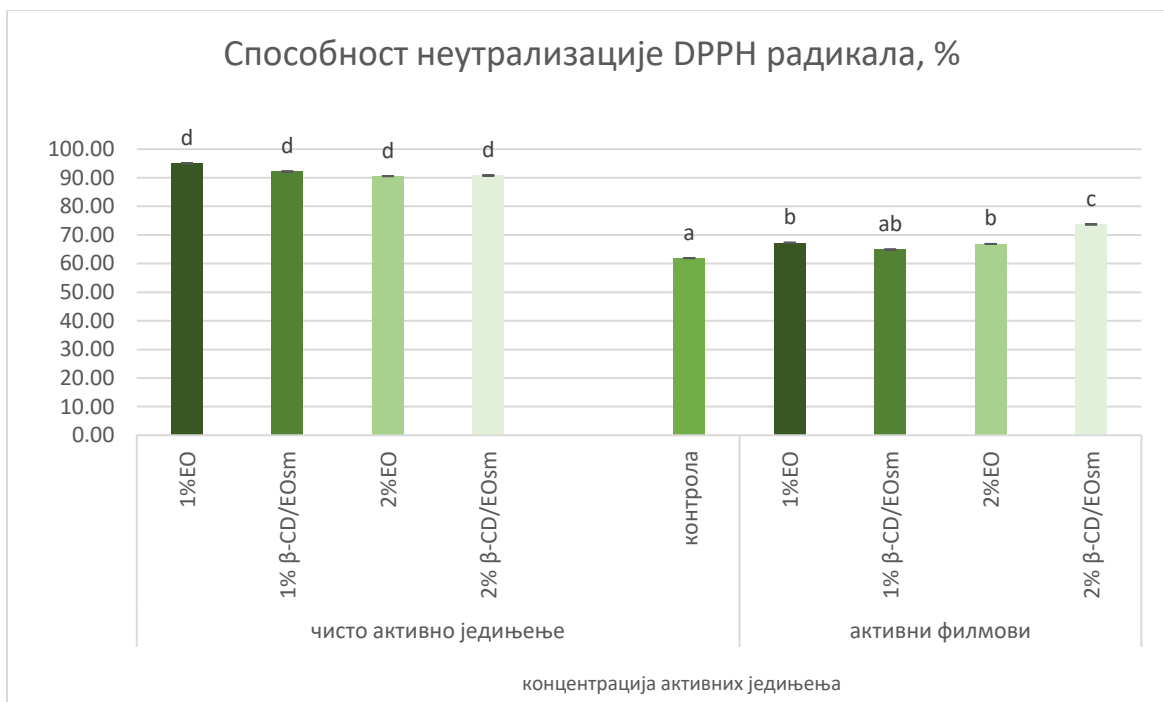
Слика 4. 39. FTIR спектри активних биополимерних филмова на бази RuOC са  $15\%$ GLY, у области таласних дужина: а)  $3500\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$  б)  $1150\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ : 1 – контрола; 2 –  $1\%$  EO; 3 –  $2\%$  EO; 4 –  $1\%$   $\beta$ -CD/EOsm 5 –  $2\%$   $\beta$ -CD/EOsm

#### 4.4.5. Антиоксидативна активност

Антиоксидативна активност биополимерних филмова на бази RuOC, испитана је само за филмове са  $30\%$  глицерола, обзиром да концентрација глицерола не би требала да има значај на биолошку функцију активних филмова. Антиоксидативна активност је одређена DPPH методом, односно на основу **способност неутрализације DPPH радикала** испитиваних узорака и дата на **Слици 4.40.** Ради лакшег одређивања утицаја активних једињења на антиоксидативну активност филмова, упоредо су дате вредности биополимерних филмова са додатком самог етарског уља *S. montana* у концентрацијама од  $1\%$  и  $2\%$ , биополимерних филмова са додатком инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/EOsm у концентрацијама од  $1\%$  и  $2\%$ , као и добијене вредности за само етарско уље *S. montana* и сам инклузиони комплекс  $\beta$ -CD/EOsm, у истим концентрацијама. Филм на бази RuOC, без додатка активних једињења је коришћен као контрола.

Поређењем добијене антиоксидативне активности самог инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/EOsm, са активношћу чистог етарског уља, не запажа се значајна разлика у добијеним вредностима способности неутрализације DPPH радикала, као ни утицај додате коцентрације EO или  $\beta$ -CD/EOsm ( $p > 0,05$ ). Ови резултати могу да указују на очување антиоксидативне активности EO *S. montana* након формирања инклузионог комплекса са  $\beta$ -

CD, односно, на успешно инкапсулирање хидрофобних компоненти, највероватније фенолних компоненти одговорних за биолошку активност ЕО, унутар шупљине  $\beta$ -CD. Нека истраживања су добила чак и повећање биолошке активности различитих једињења након њиховог инкапсулирања у различите биополимерне омотаче, у поређењу са активношћу чистих једињења (Varona *u cap.*, 2013; Khalili *u cap.*, 2015).



**Слика 4. 40.** Способност неутрализације DPPH радикала чистих активних једињења етарско уља *S. montana* и инклузионог комплекса, као и активних филмова на бази PuOC и етарског уља *S. montana* или инклузионог комплекса, у различитим концентрацијама (1 % и 2 %). Различита слова указују на значајне разлике међу узорцима ( $p < 0,05$ ).

Након инкорпорирања инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/EOsm у биополимерне композитне филмове на бази PuOC, антиоксидативна активност инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/EOsm је редукована, што је већ запажено и након додатка етарског уља *S. montana* у биополимерне филмове на бази PuOC (Поглавље 4.2.6.; Слика 4.17.). У поређењу са контролним филмом, додаток 1 %  $\beta$ -CD/EOsm није значајно утицало на његову антиоксидативну активност. Ови резултати, заједно са претходним добијеним резултатима, указују на то да додаток самог ЕО и  $\beta$ -CD/EOsm у концентрацији од 1 %, не доводи до значајног повећања способности неутрализације DPPH радикала, упркос њиховој потврђеној високој антиоксидативној активности као чистих, појединачних компоненти ( $p > 0,05$ ).

Међутим, након додатка  $\beta$ -CD/EOsm у концентрацији од 2 % у биополимерни филм на бази PuOC, запажен је значајан пораст способности неутрализације DPPH радикала



контролног филма, са 61,9 % (контрола) на 73,7 % (PuOC филм са 2 % инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/EOsm). Већа способност неутрализације DPPH радикала PuOC филма са 2 %  $\beta$ -CD/EOsm, у поређењу са PuOC филмом са 2 % етарског уља *S. montana*, је, такође, запажена. И друга истраживања су показала повећање биолошке активности биополимерних филмова након додатка различитих инкапсулираних активних једињења (*Zhaveh и сар., 2015; Kalagatur и сар., 2018*).

---

#### 4.5. Миграција карвакрола и тимола из биополимерних активних филмова са етарским уљем *S. montana* или инклузионим комплексом у модел растворе

---

Миграција, отпуштање, карвакрола и тимола, карактеристичних компоненти етарског уља *S. montana*, из пет различитих биополимерних филмова (на бази РuОC, зеина, хитозана, скроба, желатина) са 1 % етарског уља *S. montana* или 1 % инклузионог комплекса  $\beta$ -циклодекстрин/етарско уље *S. montana* ( $\beta$ -CD/EOsm), одређен је у четири различита модел раствора, симулатора прехранбених производа (96 % етанол, 10 % етанол, дестилована вода и 3 % сирћетна киселина), у циљу испитивања могућности примене различитих биополимерних композитних, протеинских и полисахаридних филмова као носача активних фенолних једињења.

Експериментални модел овог истраживања дат је у **Поглављу 3.7.; Табела 3.4.** Садржај отпушеног карвакрола у различите модел растворе, дат је на **Слици 4.41.**, док је садржај отпушеног тимола дат на **Слици 4.42.** На основу добијених резултата миграције карвакрола и тимола, у сва 4 модел раствора, запажа се значајан, и до неколико хиљада пута већи садржај карвакрола у поређењу са тимолом, што је у сагласности са хемијским саставом етарског уља *S. montana* (**Поглавље 4.1.1.; Табела 4.1.**), код ког је добијен релативан удео карвакрола од 47,69 %, и релативан удео тимола од само 0,15 %.

Резултати миграције **карвакрола** су показали да је његов највећи садржај био у модел раствору 96 % етанола (**Слика 4.41.**), односно симулатору масних намирница. Обзиром да су карвакрол и тимол фенолне компоненте, хидрофобног карактера, и да се најбоље растварају у органским растварачима, као и да се формирање инклузионог комплекса на бази  $\beta$ -CD одвија у присуству етанола, може се рећи да је овај резултат био и за очекивати. На основу добијених резултата, запажа се већи садржај отпушеног карвакрола из биополимерних филмова са 1 % етарског уља *S. montana*, у поређењу са биополимерним филмовима са 1 % инклузионог комплекса, у 96 % етанолу. Осим тога, садржај отпушеног карвакрола из биополимерних филмова са 1 % инклузионог комплекса био је значајно мањи у поређењу са садржајем карвакрола из самог инклузионог комплекса (29,15 mg/g). Највећи садржај отпушеног карвакрола у 96% етанолу, запажен је приликом одређивања миграције карвакрола из биополимерног филма на бази хитозана са 1 % етарског уља и износио је 65,52 mg/g. Ова вредност је била и до 5 пута већа у поређењу са садржајем отпушеног карвакрола из хитозанског филм са 1 % инклузионог

комплекса  $\beta$ -CD/EOsm (11,74 mg/g). Управо ови филмови су и највише бубрели у контакту са модел растворима, па је, највероватније, дошло до миграције великог садржаја активних фенолних једињења. Најмањи садржај отпушеног карвакрола у 96%EtOH, запажен је из филма на бази желатина са 1 % инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/EOsm, и износио је 0,85 mg/g.

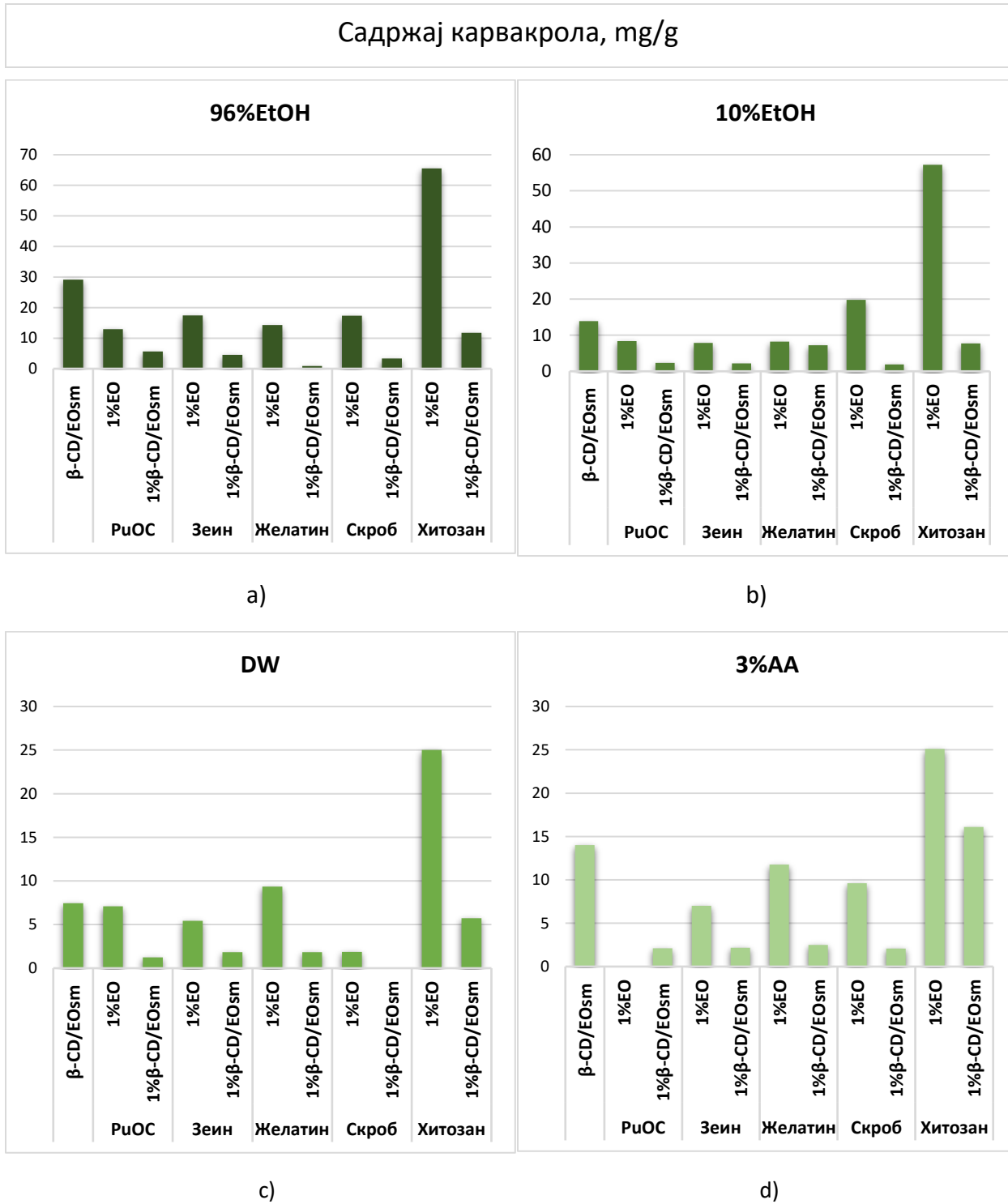
Нешто мање вредности садржаја отпушеног карвакрола забележене су у модел раствору 10% етанола, симулатора алкохолних намирница. Вредност отпушеног карвакрола из самог инклузионог комплекса била је и до два пута мања у поређењу са вредностима добијеним у 96% етанолу, и износила је 13,88 mg/g. Ови резултати могли би да потврде претпоставку да се карвакрол, као и остале фенолне компоненте најбоље растварају у органским растварачима, и да је веће присуство етанола у модел раствору омогућило већу екстракцију карвакрола из испитиваних узорака. И у овом симулатору хране највећи садржај отпушеног карвакрола запажен је приликом испитивања миграције карвакрола из биополимерног филма на бази хитозана са 1 % етарског уља, и износио је 57,19 mg/g. Најмањи садржај отпушеног карвакрола у модел раствор 10 % етанола, запажен је из биополимерног филма на бази скроба са 1 % инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/EOsm и износио је 1,87 mg/g. И код овог модел раствора, миграцијал карвакрола је била већа из филмова са 1 % етарског уља у поређењу са филмовима са 1 % инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/EOsm.

Када је у питању садржај отпушеног карвакрола у модел раствору дестиловане воде, значајно мање вредности су запажене у поређењу са вредностима добијеним код модел раствора који садрже етанол (96%EtOH и 10%EtOH). Скоро сви испитивани биополимерни филмови (PuOC, желатин и скроб) су припремљени *casting* методом где је као растварач коришћена вода, поред тога инклузиони комплекс на бази  $\beta$ -CD су формиран и искључиво у присуству воде, међутим као што је већ запажено у **Поглављу 4.3.1.**, растварач који се користи за одређивање ефикасности инкапсулације микрочестица, односно екстракцију инкапсулираних једињења игра велику улогу, и доста зависи од поларности и растворљивости инкапсулиране компоненте. Обзиром да је карвакрол изузетно хидрофобна компонента, растворљива у органским растварачима, од очекиваног је да ће његова растворљивост бити слабија у води, у поређењу са органским растварачима. Садржај отпушеног карвакрола из самог инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/EOsm био је и до 4 пута мањи у односу на садржај карвакрола у 96% етанолу, односно и до 2 пута мањи у односу на садржај карвакрола у 10% етанолу, и износио је 7,44 mg/g. Највећи садржај отпушеног карвакрола забележен је и у овом модел раствору приликом одређивања миграције карвакрола из биополимерног филма на бази хитозана са 1 % етарског уља, и износио је 25,01 mg/g. Најмањи садржај отпушеног карвакрола добијен приликом одређивања миграције карвакрола из биополимерног филма на бази PuOC са 1 % инклузионог комплекса, и износио је 1,23 mg/g. Приликом одређивања миграције

карвакрола из биополимерних филмова на бази скроба, запажен је већи садржај отпушеног карвакрола у модел раствор дестиловане воде из биополимерних филмова са 1 % инклузионог комплекса (12,04 mg/g) у поређењу са филмовима са 1 % етарског уља (1,8 mg/g).

Забележен је нешто већи садржај отпушеног карвакрола из већине биополимерних филмова у модел раствор 3 % сирћетне киселине, симулатор киселих намирница, у поређењу са резултатима добијеним код модел раствора дестиловане воде. И до два пута већи садржај отпушеног карвакрола у модел раствор 3 % сирћетне киселине је забележен из самог инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/EOsm, у поређењу са садржајем отпушеног карвакрола у модел раствор дестиловане воде, што указује на најслабију растворљивост карвакрола у модел раствор дестиловане воде, у поређењу са осталим модел растворима. Највећи садржај отпушеног карвакрола и у модел раствору 3 % сирћетне киселине, такође је забележен приликом испитивања миграције карвакрола из биополимерних филмова на бази хитозана са 1 % етарског уља, и износио је 25,09 mg/g. Приликом испитивања миграције карвакрола из биополимерног филма на бази PuOC са 1 % етарског уља, у модел раствор 3 % сирћетне киселине, није забележен садржај отпушеног карвакрола, док је садржај карвакрола из филма на бази PuOC са 1 % инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/EOsm, износио 2,09 mg/g.

На основу добијених резултата, поређењем вредности садржаја отпушеног карвакрола у сва 4 модел раствора, миграција карвакрола из биополимерних филмова са самим етарским уљем била је већа у поређењу са миграцијом карвакрола из биополимерних филмова са инклузионим комплексом. Ови резултати могу да укажу на то да није дошло до потпуне миграције карвакрола из инклузионог комплекса у модел растворе, услед заштићености фенолних компоненти етарског уља инкапсулирањем у инклузиони комплекс, и јаким веза између инклузионог комплекса и биополимерних филмова, па је са тим у вези, након инкорпорирања инклузионог комплекса у биополимерне филмове отпуштање карвакрола било још више отежано. Овакво запажање могло би да укаже на успешно формирање инклузионог комплекса и инкапсулирање етарског уља *S. montana* у  $\beta$ -циклодекстрин, чиме су фенолне компоненте етарског уља заштићене од различитих спошањих услова.



**Слика 4. 41.** Миграција карвакрола из активних биополимерних филмова са етарским ујем *S. montana* или инклузионим комплексом, у модел растворе: а) 96%EtOH; б) 10%EtOH; в) DW; д) 3%AA

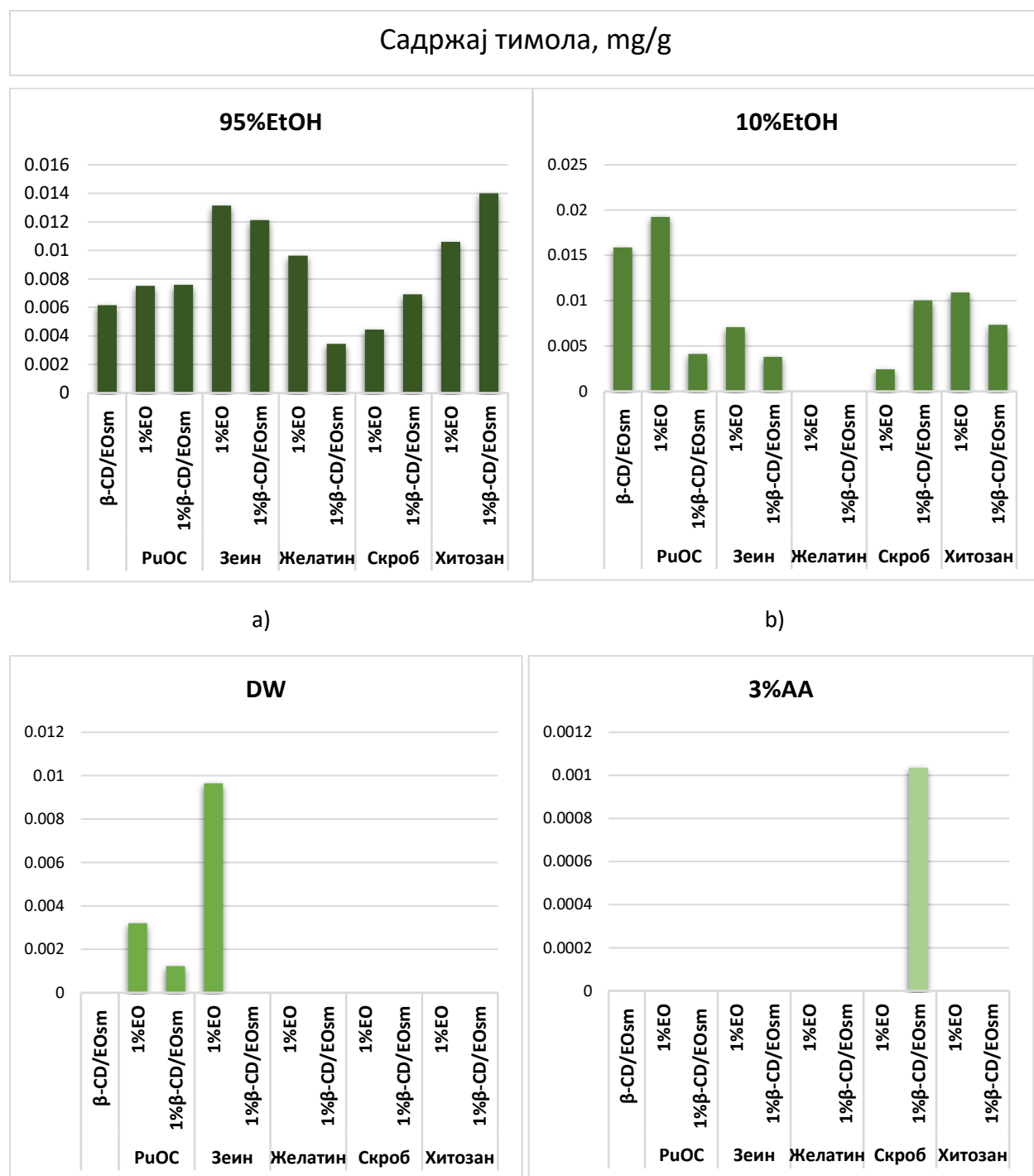
Резултати миграције тимола су показали да је садржај отпушеног тимола у сва четири модел раствора, код свих биополимерних филмова био значајно мањи у поређењу са добијеним вредностима карвакрола, обзиром на његов мањи релативни удео (0,15 %) код испитиваног етарског уља (**Слика 4.42.**).

Као и код карвакрола, највећи садржај отпушеног тимола забележен је у модел растворима етанола (96 % и 10 %), док код дестиловане воде и 3 % сирћетне киселине, код већине испитиваних филмова, садржај отпушеног тимола није забележен. Тимол, као и карвакрол представља хидрофобну компоненту растворљиву у органским растварачима, што је и у складу са добијеним резултатима.

Највећи садржај отпушеног тимола у модел раствор 96 % етанола, забележен је приликом одређивања миграције тимола из хитозанског филма са 1 % инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/EOsm (0,013 mg/g) и зеинског филма са 1 % етарског уља (0,013 mg/g). За разлику од садржаја отпушеног карвакрола, у случају тимола биополимерни филмови на бази погаче уљане тикве голице, скроба и хитозана са 1 % инклузионог комплекса показали су веће вредности садржаја отпушеног тимола у поређењу са филмовима са 1 % етарског уља. Запажен је и већи садржај отпушеног тимола из поменутих филмова у односу на садржај отпушеног тимола из самог инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/EOsm. Ови резултати можда могу да укажу на слабију могућност инкапсулације тимола у инклузиони комплекс, у поређењу са карвакролом, односно на већи афинитет  $\beta$ -циклодекстрина према карвакролу, што је довело до лакше миграције тимола у испитиване модел растворе.

Код испитивања миграције тимола из биополимерних филмова на бази желатина у модел раствор 10 % етанола, није забележен садржај отпушеног тимола, док је забележен већи садржај отпушеног тимола из филмова на бази скроба са 1 % инклузионог комплекса у поређењу са садржајем отпушеног тимола из 1 % етарског уља. Садржај отпушеног тимола из самог инклузионог комплекса  $\beta$ -CD/EOsm у модел раствор 10 % етанола, био је скоро три пута већи у поређењу са резултатима добијеним у модел раствору 96 % етанола, и износио је 0,016 mg/g. Запажен је већи садржај отпушеног тимола из биополимерних филмова на бази РnОС, зеина и хитозана са 1 % етарског уља у поређењу са филмовима на бази поменутих сировина са 1 % инклузионог комплекса

Садржај отпушеног тимола из инклузионог комплекса, биополимерних филмова на бази зеина са 1 % инклузионог комплекса, као и из биополимерних филмова на бази желатина, скроба и хитозана са активним једињењима, није забележен у модел раствору дестиловане воде. Док је садржај отпушеног тимола у модел раствору 3 % сирћетној киселини забележен само из филма на бази скроба са 1 % инклузионог комплекса.



**Слика 4. 42.** Миграција тимола из активних биополимерних филмова са етарским уљем *S. montana* или инклузионим комплексом, у модел раствору: а) 96%EtOH; б) 10%EtOH; в) DW; д) 3%AA

### Релативни значај утицајних параметара на миграцију карвакрола и тимола

Модел вештачке неуронске мреже ANN је коришћен за испитивање могућности предвиђања садржаја отпуштеног карвакрола и тимола из различитих биополимерних филмова ( на бази РnОС, зеина, желатина, скроба, хитозана) са 1 % етарског уља *S. montana* или инклузионим комплексом  $\beta$ -CD/EOsm, у функцији врсте биополимерног филма и коришћеног модел раствора, симулатора хране.

Према перформансама ANN, оптималан број неурона у скривеном слоју за садржаја отпуштеног карвакрола и тимола је био 8 (мрежа MLP 16-8-2) да би се постигле високе вредности коефицијента детерминације  $r^2$  (**Табела 4.15.**). Сума квадрата одступања (енгл. *sum of squares* - SOS) вредности добијене коришћем постављеног ANN модела су биле истог реда величине као експерименталне грешке забележене у литератури (*Basheer и Hajmeer, 2001; Montaño и Palmer, 2003; Kollo и von Rosen, 2005;*).

**Табела 4. 15.** Резиме модела вештачке неуронске мреже (перформансе и грешке) за циклусе обуке, тестирања и валидације

Неуронска мрежа	Перформансе			Грешка			Алгоритам за тренинг	Функција грешке	Активациона функција	
	Трен.	Тест.	Валид.	Трен.	Тест.	Валид.			Скривени	Излазни
MLP 15-8-2	0,999	0,999	0,998	0,000	0,002	0,001	BFGS 185	SOS	Tanh	Identity

\*Термин перформансе представља коефицијенте детерминације, док термини грешака указују на грешку ANN модела

Развијени ANN модел је имао сложену структуру (са 154 тежинска коефицијента) услед изражене нелинеарне природе развијеног система (*Montgomery, 1984; Kollo и von Rosen, 2005*). Вредност  $r^2$  између експерименталних података и резултата ANN модела садржаја отпуштеног карвакрола и тимола је била 0,999 циклуса учења ANN мреже.

**Табела 4.16.** и **Табела 4.17.** представљају  $W_1$ ,  $B_1$ ,  $W_2$  and  $B_2$  за прорачун садржај карвакрола и тимола.

Добијени оптимални модел неуронске мреже је показао добру способност генерализације експерименталних података, и може се користити за прецизно предвиђање садржаја отпуштеног карвакрола и тимола, из широког спектра улазних параметара као што су врста биополимерног филма и модел раствор.

### Оптимизација ANN резултата

Оптимизација излаза ANN модела изведена је коришћењем резултата представљених у **Табели 4.16.** и **Табели 4.17.**, примењеним у **Једначини 3.8.** Израчунати максимум садржаја отпуштеног карвакрола био је 65,52 mg/g. Оптимални учинак садржај



отпушеног карвакрола постигнут је коришћењем следећих параметара: филм на бази хитозана са 1 % етарског уља и модел раствор 95%EtOH. Израчунати максимум садржаја отпушеног тимола био је: 0,019 mg/g. Оптимални учинак за садржај отпушеног тимола постигнут је коришћењем улаза: филм на бази  $PuOC$  са 1 % етарског уља и модел раствор 10%EtOH. Ови резултати су у доброј сагласности са експерименталним резултатима.

ANN модел у облику MLP 15-8-2 мреже, коришћен за предвиђање садржаја отпушеног карвакрола и тимола, показао је добро поклапање са експерименталним резултатима. Анализа глобалне осетљивости (заснована на *Yoon*-овој једначини), која се која се заснива на ANN моделу показала је утицај улазних променљивих, као што су врста биополимерног филма и модел раствора, и показали су утицај ових променљивих на садржај карвакрола и тимола.

**Табела 4. 16.** Елементи матрице  $W_1$  и вектор  $B_1$  за садржај карвакрола и тимола

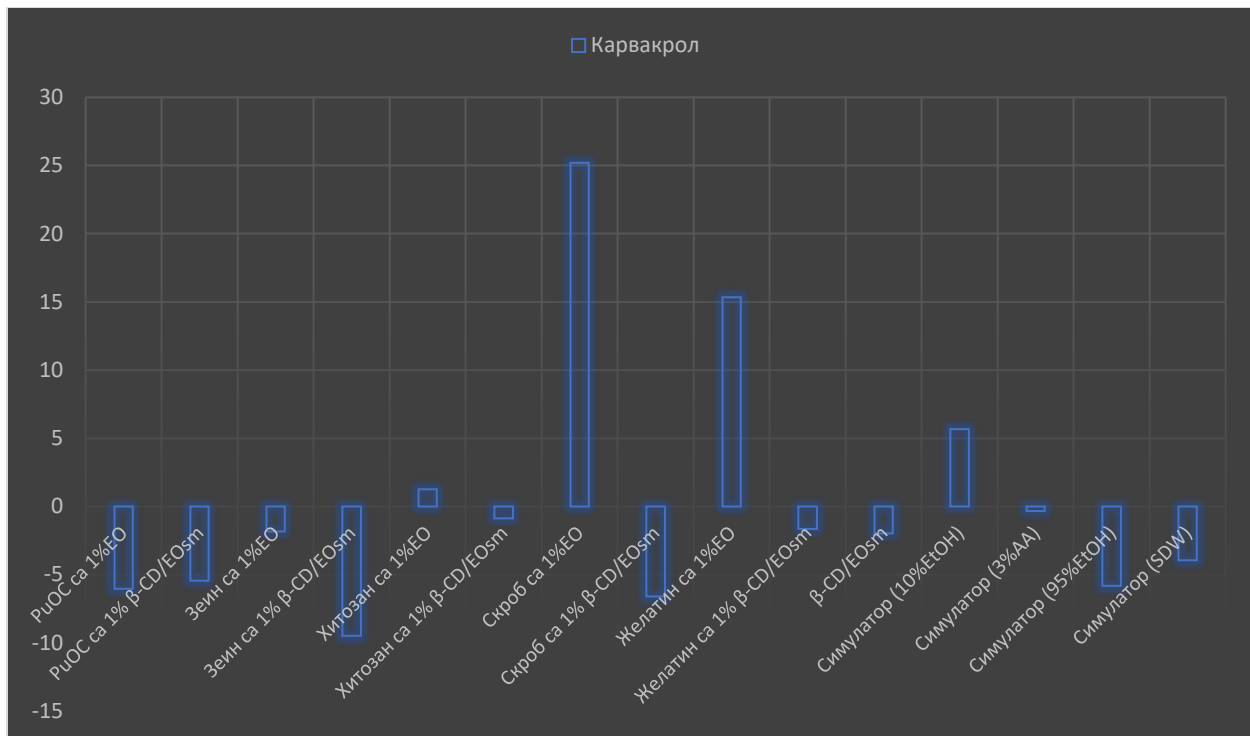
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>PuOC</i> са 1%EO	-0,698	1,072	-0,244	0,110	-0,229	0,490	-0,181	-0,053
<i>PuOC</i> са 1% $\beta$ -CD/EOsm	0,419	-0,166	0,071	0,409	0,179	-0,146	0,146	0,186
Зеин са 1%EO	-0,191	-0,258	-0,168	0,221	-0,041	-0,012	-0,270	0,196
Зеин са 1% $\beta$ -CD/EOsm	-0,063	-0,193	-0,461	-0,392	0,302	0,586	-0,610	-0,429
Хитозан са 1%EO	-0,216	-0,583	-0,343	-0,196	0,003	-0,170	0,005	0,745
Хитозан са 1% $\beta$ -CD/EOsm	0,171	-0,744	-0,161	0,034	0,278	-0,199	0,109	0,251
Скроб са 1%EO	-0,209	-0,373	0,954	-0,355	-0,437	0,511	0,090	0,024
Скроб са 1% $\beta$ -CD/EOsm	0,683	0,007	0,550	0,372	0,057	-1,606	0,295	-0,323
Желатин са 1%EO	0,190	0,496	0,023	0,102	-0,116	-0,024	0,344	0,286
Желатин са 1% $\beta$ -CD/EOsm	-0,034	0,152	-0,021	-0,487	0,105	-0,541	0,292	-0,202
$\beta$ -CD/EOsm	0,400	0,609	-0,374	0,147	0,258	0,274	0,369	-0,243
Симулатор (10%EtOH)	-0,036	0,297	-0,312	0,250	0,612	0,623	-0,452	-0,497
Симулатор (3%AA)	0,816	-1,784	0,488	-1,110	-0,165	-0,832	1,207	0,918
Симулатор (96%EtOH)	-0,477	2,674	-1,738	0,646	0,374	0,758	-0,275	-0,948
Симулатор (DW)	-0,016	-1,535	1,163	0,162	-0,606	-1,143	0,020	1,312
<i>Bias</i>	0,291	-0,290	-0,354	-0,086	0,275	-0,600	0,471	0,721

**Табела 4. 17.** Елементи матрице  $W_2$  и вектор  $B_2$  за садржај карвакрола и тимола

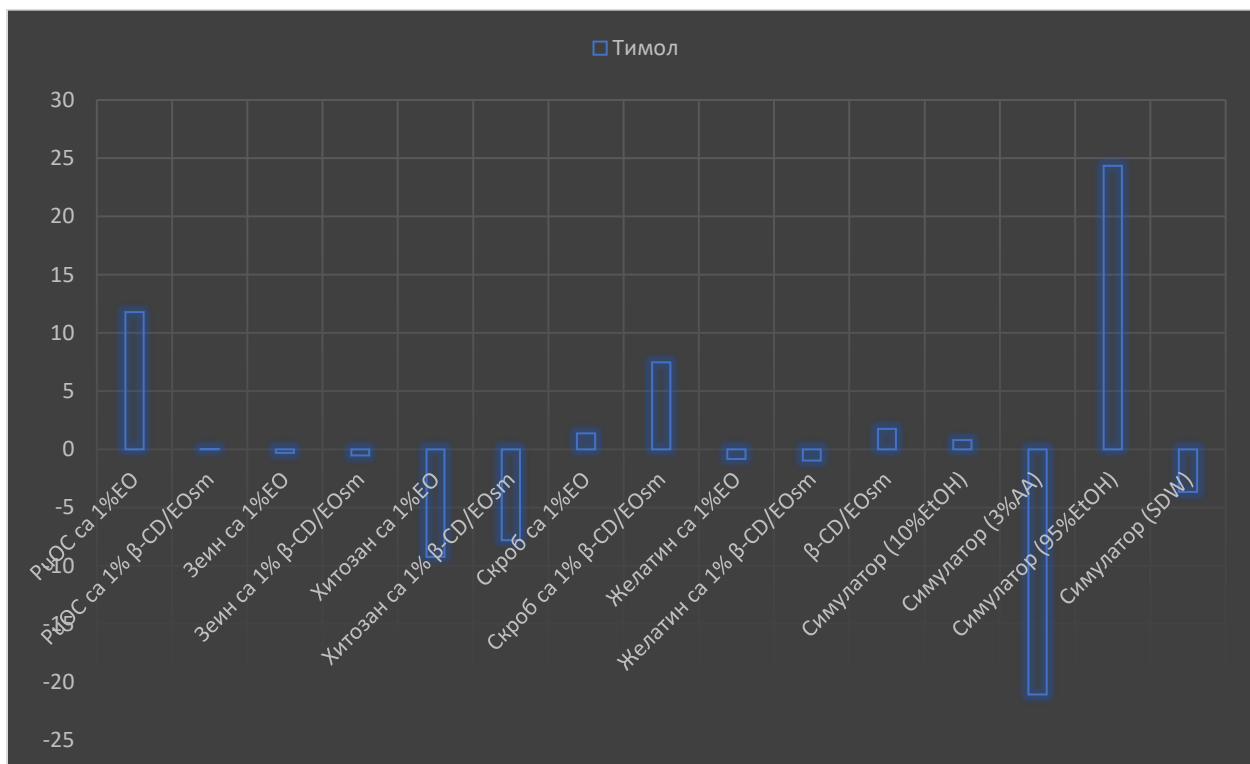
	1	2	3	4	5	6	7	8	<i>Bias</i>
<i>Карвакрол</i>	-0,505	0,003	0,491	-0,123	0,884	-0,536	0,240	-0,611	0,210
<i>Тимол</i>	0,471	0,938	0,036	-0,282	-0,092	-0,218	-0,929	0,728	0,313

### Анализа глобалне осетљивости

У овом одељку проучаван је утицај улазних променљивих. На основу добијених резултата представљених на **Слици 4.43.**, филм на бази скроба са 1 % етарског уља, и модел раствор 10%EtOH, били су утицајнији параметри за садржај отпушеног карвакрола са приближно релативном важношћу од 25,19 % и 5,68 %, редом. Филм на бази РцОС и 1 % етарског уља и модел раствор 95%EtOH, били су најутцајнији параметри за садржај отпушеног тимола са приближно релативном важношћу од 11,78 %, односно 24,34 %, респективно (**Слика 4.44.**).



**Слика 4. 43.** Релативни значај утицајних параметара на садржај отпуштеног карвакрола



**Слика 4. 44.** Релативни значај утицајних параметара на садржа отпуштеног тимола

## **5. ЗАКЛЪУЧЦИ**

На основу реализованих циљева докторске дисертације, добијених и продискутованих резултата, могу се извести следећи закључци:

- У етарском уљу ртањског чаја, *Satureja montana* L., идентификовано је 35 компоненти међу којима су монотерпени били најзаступљенији, а карвакрол са релативним уделом од 47,69 %, представљао је основно једињење овог етарског уља. У већем проценту су били заступљени и *p*-цимен (27,41 %) и  $\gamma$ -терпинен (7,36 %), па је на основу хемијског састава закључено да етарско уље припада фенолном-карвакрол хемотипу. Структурна својства етарског уља *S. montana* потврдила су присуство доминантних једињења, карвакрол и *p*-цимен, поређењем карактеристичних пикова добијених на FTIR спектру. Повећањем концентрације етарског уља (1-5 %) дошло је до повећања апсорбанци пикова, посебно оних карактеристичних за групе присутне у фенолним једињењима, што је указало на повећање фенолних једињења са повећањем концентрације етарског уља. Ово запажање је потврђено приликом одређивања укупног садржаја фенола у етарском уљу, где је забележен висок садржај фенола већ при концентрацији од 1 % етарског уља (12,55 mg GK/mL), а са повећањем концентрације (2-5 %), повећао се и садржај фенола у уљу ( $p > 0,05$ ). Способност неутрализације DPPH радикала је била оптимална већ при концентрацији од 1 % (76,32 %), док су веће концентрације (2-5 %) показале активност већу од 90 % ( $p > 0,05$ ). Етарско уље *S. montana*, показало је и значајну редукциону моћ у свим испитиваним концентрацијама, која је при концентрацији од 1 % етарског уља износила 0,94, а при концентрацији од 2 %, 1,19. Код концентрација већих од 2 % добијене апсорбанце су биле ван опсега. Међутим, забележена је слаба активност неутрализације OH радикала (око 40 %) за све испитиване концентрације етарског уља. Испитивање антибактеријске активности етарског уља *S. montana* указало је на широк спектар деловања овог етарског уља у концентрацијама већим од 3 %, и показало активност према испитиваним грам-позитивним (*L. monocytogenes*, *S. aureus* и *B. cereus*) и грам-негативним (*E. coli* и *S. Enteritidis*) бактеријама. Најосетљивија бактерија била је *B. cereus*, где је добијена зона инхибиције етарског уља била 23 mm, а најмање осетљива бактерија *L. monocytogenes*, где је добијена зона инхибиције етарског уља у концентрацији од 5 % била 10 mm. Претпоставља се да је за оптимална биолошка својства етарског уља *S. montana* одговоран највише карвакрол, али и друге компоненте етарског уља које, услед синергистичког деловања, доприносе његовој активности.
- У етарском уљу босиљка, *Ocimum basilicum* L., идентификована је 51 компонента међу којима су монотерпени били најзаступљенији, са линалолом као најзаступљенијом компонентом са релативним уделом од 43,69 %. Све остале појединачне компоненте биле су присутне у врло малом проценту, мањем од 5 %, а највећи број њих у уделу мањем од 2 %. На основу одређеног хемијског састава закључено је да етарско уље припада линалолском хемотипу (хемотип А).

Структурна својства етарског уља *O. basilicum* потврдила су присуство најдоминантнијег једињења, линалола, појавом карактеристичних пикова на FTIR спектру, где је са повећањем концентрације етарског уља дошло до повећања пикова који одговарају групама присутним у фенолним једињењима. Међутим, етарско уље *O. basilicum* је имало значајно нижи садржај фенола (и до девет пута при концентрацији етарског уља од 1 % (1,46 mg GK/mL)), у поређењу са етарским уљем *S. montana*, што је утицало и на његову биолошку активност. Добијена је оптимална антиоксидативна активност у виду способности неутрализације DPPH радикала (од 44,37 %, за етарско уље у концентрацији од 1 %, до 91,94 %, за етарско уље у концентрацији од 5 %) и редукционе моћи (од 0,22, за етарско уље у концентрацији од 1 %, до 0,59 за етарско уље у концентрацији од 5 %), док је приликом одређивања способности неутрализације OH радикала, етарско уље *O. basilicum* показало про-оксидативну активност у свим испитиваним концентрацијама (1 – 5 %).

- Додатком етарског уља *S. montana* или *O. basilicum* у биополимерне амбалажне материјале на бази погаче уљане тикве голице, запажа се њихов значајан утицај на особине добијених филмова. Присуство жућкасте нијансе и јаког ароматичног мириса на етарска уља, посебно етарског уља *S. montana*, запажено је код добијених филмова. Веће концентрације довеле су до појаве нехомогене површине филма, услед лошије емулзификације, али без видљивих пора или пукотина, које би могле значајно да утичу на његове особине. Дебљина филмова на бази погаче уљане тикве голице је повећана са додатком етарских уља, док је дошло до слабљења механичких особина филмова, односно до смањења затезне јачине за око 70 %, и издужења при кидању, за око 50 %. За разлику од физичко-механичких особина, додаток етарских уља *S. montana* и *O. basilicum* у биополимерне амбалажне материјале на бази погаче уљане тикве голице, побољшало је физичко-хемијска и баријерна својства према воденој пари и светлости, добијених биополимерних филмова. Бубрење филмова у води је значајно смањено и до 28 % након додатка 5 % етарског уља *S. montana*, односно и до 37 % након додатка 5 % етарског уља *O. basilicum* ( $p < 0,05$ ) док је забележено и незнатно смањење садржаја влаге и укупне растворљивости. Брзина пропустљивости водене паре кроз филмове је смањена за око 30 %. Добијени резултати су указали на повећање хидрофобности биополимерних филмова са додатком липофилних етарских уља са јаким хидрофобним карактером, односно на смањење осетљивости биополимерних филмова на влагу, воду и водену пару. Смањење хидрофилног карактера филмова потврђено је и применом FTIR спектроскопије, услед повећања апсорпције пикова карактеристичних за хидрофобне групе у филму, односно смањење апсорпције пикова карактеристичних за хидрофилне групе у филму. Поред побољшања баријерних својстава филмова према воденој пари, са додатком етарских уља *S. montana* и *O. basilicum*, побољшана су и баријерна својства према UV и VIS светлости.

Након додатка етарских уља у активне биополимерне филмове, запажен је благи пораст способности неутрализације слободних радикала (DPPH и OH) добијених филмова, при чему је нестао про-оксидативни ефекат самог етарског уља *O. basilicum*. Запажен је и значајни пораста редукционе моћи, и до 63 % након додатка 5 % етарског уља *S. montana*, и до 33 % након додатка 5 % етарског уља *O. basilicum* филмова на бази погаче уљане тикве голице. Додатак етарског уља *S. montana*, у концентрацијама већим од 3 %, значајно је побољшало антибактеријску активност биополимерног филма на бази погаче уљане тикве голице, према различитим грам-позитивним и грам-негативним бактеријама. Најосетљивије бактерије биле су *S. Enteritidis*, *B. cereus*, и *S. aureus*, где су добијене зоне инхибиције филмова на бази погаче уљане тикве голице са 5 % етарског уља, биле 22 mm, 18,5 mm и 17,5 mm, редом, док су најмање осетљиве бактерије биле *E. coli* и *L. monocytogenes*, код којих су добијене зоне инхибиције истих филмова биле 13 mm. За разлику од етарског уља *S. montana*, додаток етарског уља *O. basilicum* у биополимерне филмове на бази погаче уљане тикве голице, није показао допринос на антибактеријску активност филма на бази погаче уљане тикве голице.

- Етарско уље *S. montana* је успешно инкапсулирано у  $\beta$ -циклодекстрин, при чему је дошло до формирања инклузионог комплекса при сва три испитана односа етарског уља и  $\beta$ -циклодекстрина (10:90; 15:85; 20:80), код оба поступка сушења (сушница, лиофилизација). Добијени инклузиони комплекси су кристалног, ромбоидног облика, са потпуно различитом морфологијом и значајно мањим пречником честица у поређењу са самим  $\beta$ -циклодекстрином. Настале промене у карактеристичним тракама на FTIR спектру, нестајање, ширење и варијације у интезитету пика, указују на успешно формирање инклузионог комплекса. Однос етарског уља *S. montana* и  $\beta$ -циклодекстрина - 10:90 и сушење у лиофилизатору дало је инклузиони комплекс са највећим процентом ефикасности инкапсулације (88,3 %), што је потврђено и применом модела вештачке неуронске мреже.
- Додатак инклузионог комплекса у биополимерне амбалажне материјале на бази погаче уљане тикве голице, у концентрацијама 1 % и 2 %, значајно је утицало на особине филма. Дебљина филмова је значајно повећана након додатка инклузионог комплекса, док је код механичких особина затезна јачина значајно повећана и до 55 % код активних филмова са 15 % глицерола, односно и до 35 % код активних филмова са 30 % глицерола, а издужење при кидању значајно смањено и до 95 % код филмова са обе испитиване концентрације глицерола ( $p < 0,05$ ). Као и код додатка чистих етарских уља, физичко-хемијске особине и баријерна својства су значајно побољшана. Осетљивост филмова на влагу, воду и водену пару је смањена, а поређењем са филмовима са чистим етарским уљима, добијено је веће смањење осетљивости, односно мањи садржај влаге, мање бубрење у води и мања пропустљивост водене паре за скоро 60 %. Додатком инклузионог комплекса у филмове, дошло је до смањења трансмисије светлости филма на бази погаче уљане

тикве голице и за 98 % у видљивом делу спектра. FTIR спектри су потврдили присуство инклузионог комплекса у филмовима и нових насталих веза између инклузионог комплекса и компоненти филма. Антиоксидативна активност самог инклузионог комплекса, у виду способности неутрализације DPPH радикала, била је упоредива са антиоксидативном активношћу чистог етарског уља. Постигнуто је и значајно повећање способности неутрализације DPPH радикала активних филмова на бази погаче уљане тикве голице, након додатка 2 % инклузионог комплекса ( $p < 0,05$ ). Поред повећања активности контролног филма, запажена је и значајно већа антиоксидативна активност филма са инклузионим комплексом у поређењу са активношћу филма са чистим етарским уљем у истој концентрацији (2 %). Ови резултати указују на заштиту етарског уља од различитих фактора, њиховим инкорпорирањем у инклузиони комплекс на бази  $\beta$ -циклодекстрина. Такође, указују на могућност добијања активних амбалажних материјала са  $\beta$ -циклодекстрина/етарско уље *S. montana* инклузионим комплексом, што је довело до повећања антиоксидативне активности ових биополимерних филмова.

- Резултати миграције карвакрола су показали да је његов највећи садржај био у модел растворима етанола (96 % и 10 %), обзиром на његову хидрофобну природу и бољу растворљивост у органским растварачима. Већи садржај отпуштеног карвакрола, у сва 4 симулатора хране, имали су филмови са 1 % чистог етарског уља у поређењу са филмовима са додатком 1 % инклузионог комплекса. Ови резултати могу да укажу на чињеницу да није дошло до потпуног отпуштања-миграције карвакрола из инклузионог комплекса у модел растворе, услед заштићености фенолних компоненти етарског уља инкапсулирањем у инклузиони комплекс, и јаким веза између инклузионог комплекса и биополимерних филмова, па је након инкорпорирања инклузионог комплекса у биополимерне филмове миграција карвакрола била још више отежана. Највећи садржај отпуштеног карвакрола, код сва 4 симулатора прехранбених намирница, добијен је код хитозанских филмова са 1 % етарског уља, који су током анализе највише бубрили у испитиваним модел растворима, чиме је омогућено и лакше миграње инкорпорираних активних једињења. Добијени резултати указују на успешно инкапсулирање етарског уља *S. montana* у  $\beta$ -циклодекстрин, и могућност добијања различитих биополимерних амбалажних материјали са додатком инклузионог комплекса  $\beta$ -циклодекстрина и етарског уља *S. montana*. Ови активни биополимерни амбалажни материјали би могли да имају потенцијалну примену као носачи инклузионог комплекса у циљу постизања споријег отпуштања активне компоненте у контакту са производом. Резултати миграције тимола су показали да је садржај отпуштеног тимола у сва четири модел раствора, код свих биополимерних филмова био значајно мањи у поређењу са добијеним вредностима карвакрола, обзиром на његов мањи релативни удео (0,15 %) код испитиваног етарског уља. Као и код карвакрола, највећи садржај отпуштеног тимола забележен је у модел растворима етанола (96 %



и 10 %), док код дестиловане воде и 3 % сирћетне киселине, код већине испитиваних филмова, садржај отпушеног тимола није забележен. За разлику од садржаја отпушеног карвакрола, у случају тимола биополимерни филмови на бази погаче уљане тикве голице, скроба и хитозана са 1 % инклузионог комплекса показали су веће вредности садржаја отпушеног тимола у поређењу са филмовима са 1 % етарског уља. Ови резултати можда могу да укажу на слабију могућност инкапсулације тимола у инклузиони комплекс, у поређењу са карвакролом, односно на већи афинитет  $\beta$ -циклодекстрина према карвакролу, што је довело до лакше миграције тимола у испитиване модел растворе.

На основу добијених и продискутованих резултата, генерално се може закључити да се погача уљане тикве голице може успешно користити за добијање активног, биоразградивог амбалажног материјала са потенцијалом примене у прехранбеној индустрији. Добијени резултати представљају допринос науци али и добру основа за бројне правце будућих истраживања.

## ***6. ЛИТЕРАТУРА***

1. Abarca, R.L., Rodríguez, F.J., Guarda, A., Galotto, M.J., Bruna, J.E., Fávoro Perez, M.A., Souza, F.R., Padula, M. (2017). Application of  $\beta$ -cyclodextrin/2-nonanone inclusion complex as active agent to design of antimicrobial packaging films for control of *Botrytis cinerea*. *Food and Bioprocess Technology*, 10, 1585–1594.
2. Abarca, R.L., Rodríguez, F.J., Guarda, A., Galotto, M.J., Bruna, J.E. (2016). Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. *Food Chemistry*, 196, 968–975.
3. Abdelhedi, O., Nasri, R., Jridi, M., Kchaou, H., Nasreddine, B., Karbowiak, T. (2018). Composite bioactive films based on smooth-hound viscera proteins and gelatin: Physicochemical characterization and antioxidant properties. *Food Hydrocolloids*, 74, 176–186.
4. Abdollahi, M., Damirchi, S., Shafafi, M., Rezaei, M., Ariaei, P. (2019). Carboxymethyl cellulose-agar biocomposite film activated with summer savory essential oil as an antimicrobial agent. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 561–568.
5. Adams, M.R., Moss, M.O. (2008). *Food Microbiology*. 3rd ed. Cambridge: RSC Publishing.
6. Adams, R. P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4<sup>th</sup> edition. Illinois, Allured Publishing, 24.
7. Adel, A.M., Ibrahim, A.A., El-Shafei, A.M., Al-Shemy, M.T. (2019). Inclusion complex of clove oil with chitosan/ $\beta$ -cyclodextrin citrate/oxidized nanocellulose biocomposite for active food packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 20, 100307.
8. Aeschbach, R., Loliger, J., Scott, B.C., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B., Aruoma, O.I. (1994). Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology*, 32, 31-36.
9. Ahmad, M., Benjakul, S., Prodpran, T., Agustini, T.W. (2012). Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. *Food Hydrocolloids*, 28 (1), 189–199.
10. Ahmed, A.H., Hussein, K., Alsyari, A.H., Ibrahim, H.M., Altanobi, L. (2017). Chemotaxonomy and spectral analysis (GC/MS and FT-IR) of essential oil composition of two *Ocimum basilicum* L. varieties and their morphological characterization. *Jordan Journal of Chemistry*, 12 (3), 147-160.
11. Aliheidari, N., Fazaeli, M., Ahmadi, R., Ghasemlou, M., Emam-Djomeh, Z. (2013). Comparative evaluation on fatty acid and *Matricaria recutita* essential oil incorporated into casein-based film. *International Journal of Biological Macromolecules*, 56, 69–75.
12. Al-Maskri, A.Y., Hanif, M.A., Al-Maskari, M.Y., Abraham, A.S., Al-sabahi, J.N., Al-Mantheri, O. (2011). Essential oil from *Ocimum basilicum* (Omani Basil): A desert crop. *Natural Product Communications*, 6 (10), 1487-1490.
13. Amankwaah, C. (2013). Incorporation of selected plant extracts into edible chitosan films and the effect on the antiviral, antibacterial and mechanical properties of the material. PhD dissertation, The Ohio State University, OH, USA.
14. Amorati, R., Foti, M.C., Valgimigli, L. (2013). Antioxidant activity of essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 10835–10847.
15. Anaya-Castro, M.A., Ayala-Zavala, J.F., Muñoz-Castellanos, L., Hernández-Ochoa, L., Peydecastaing, J., Durrieu, V. (2017).  $\beta$ -Cyclodextrin inclusion complexes containing clove (*Eugenia caryophyllata*) and

- Mexican oregano (*Lippia berlandieri*) essential oils: Preparation, physicochemical and antimicrobial characterization. *Food Packaging and Shelf Life*, 14, 96-101.
16. Andrade-Del Olmo, J., Pérez-Álvarez, L., Hernáez, E., Ruiz-Rubio, L., Vilas-Vilela, J. L. (2019). Antibacterial multilayer of chitosan and (2-carboxyethyl)-  $\beta$ -cyclodextrin onto polylactic acid (PLLA). *Food Hydrocolloids*, 88, 228-236.
  17. Appendini, P., Hotchkiss, J.H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3, 113–126.
  18. Arfat, Y.A., Benjakul, S., Prodpran, T., Sumpavapol, P., Songtipya, P. (2014). Properties and antimicrobial activity of fish protein isolate/fish skin gelatin film containing basil leaf essential oil and zinc oxide nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 41, 265–273.
  19. Arrieta, M.P., Peltzer, M.A., del Carmen Garrigós, M., Jiménez, A. (2013). Structure and mechanical properties of sodium and calcium caseinate edible active films with carvacrol. *Journal of Food Engineering*, 114, 486–494.
  20. Asslisi, C. (2011). Active Packaging of Ground Coffee Using Cyclodextrin-Containing Cellophane Films. Master's Thesis, Corvinus University, Budapest, Hungary.
  21. ASTM D5576:00 (2013). Standard Practice for Determination of Structural Features in Polyolefins and Polyolefin Copolymers by Infrared Spectrophotometry (FT-IR). ASTM International, West Conshohocken, PA, 2013.
  22. ASTM standard D882-10 (2010). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. ASTM international, Pennsylvania.
  23. Astray, G., Mejuto, J.C., Morales, J., Rial-Otero, R., Simal-Gándara, J. (2010). Factors controlling flavors binding constants to cyclodextrins and their applications in foods, *Food Research International*, 43 (4), 1212-1218.
  24. Atares, L., Chiralt, A. (2016). Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 48, 51–62.
  25. Atarés, L., De Jesús, J., Talens, P., Chiralt, A. (2010). Characterization of SPI-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering*, 99, 384–391.
  26. Ayala-Zavala, J.F., del Toro-Sánchez, L., Alvarez-Parrilla, E., González-Aguilar, G.A. (2008). High relative humidity in-package of fresh-cut fruits and vegetables: Advantage or disadvantage considering microbiological problems and antimicrobial delivering systems? *Journal of Food Science*, 73 (4), 41-47.
  27. Aytac, Z., Ipek, S., Durgun, E., Tekinay, T., Uyar, T. (2017a). Antibacterial electrospun zein nanofibrous web encapsulating thymol/cyclodextrin-inclusion complex for food packaging. *Food Chemistry*, 233, 117–124.
  28. Aytac, Z., Keskin, N.O.S., Tekinay, T., Uyar, T. (2017b). Antioxidant  $\alpha$ -tocopherol/ $\gamma$ -cyclodextrin-inclusion complex encapsulated polylactic acid electrospun nanofibrous web for food packaging. *Journal of Applied Polymer Science*, 134, 44858.
  29. Bahram, S., Rezaei, M., Soltani, M., Kamali, A., Ojagh, S.M., Abdollahi, M. (2012). Whey protein concentrate edible film activated with cinnamon essential oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38, 1251–1258.

30. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils-a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446-75.
31. Barba, C., Eguinoa, A., Maté, J.I. (2015). Preparation and characterization of  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes as a tool of a controlled antimicrobial release in whey protein edible films. *LWT - Food Science and Technology*, 64, 1362-1369.
32. Baser, K. H. C., Ozek, T., Kirimer, N., Tumen, G. (2004). A comparative study of the essential oils of wild and cultivated *Satureja hortensis* L. *Journal of essential oil Research*, 16, 422-424.
33. Basheer, I.A. Hajmeer, M. (2001). Artificial Neural Networks: Fundamentals, Computing, design, and application. *Journal of Microbiological Methods*, 43 (1), 3-31.
34. Bazzano, M., Barolo, C., Buscaino, R., D'Agostino, G., Ferri, A., Sangermano, M., Pisano, R. (2016). Controlled atmosphere in food packaging using ethylene- $\alpha$ -cyclodextrin inclusion complexes dispersed in photocured acrylic films. *Industrial & Engineering Chemistry*, 55, 579–585.
35. Ben Arfa, A., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N., Chalier, P. (2006). Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 149–154.
36. Benavides, S., Villalobos-Carvajal, R., Reyes, J.E. (2012). Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. *Journal of Food Engineering*, 110, 232–239.
37. Benelli, G., Pavela, R., Canale, A., Cianfaglione, K., Ciaschetti, G., Conti, F., Nicoletti, M., Senthil-Nathan, S., Mehlhorn, H., Maggi, F. (2017). Acute larvicidal toxicity of five essential oils (*Pinus nigra*, *Hyssopus officinalis*, *Satureja montana*, *Aloysia citrodora* and *Pelargonium graveolens*) against the filariasis vector *Culex quinquefasciatus*: Synergistic and antagonistic effects. *Parasitology International*, 66 (2), 166–171.
38. Bezbradica, D.I., Tomovic, J.M., Vukasinovic, M.S., Siler-Marinkovic, S., Ristic, M.M. (2005). Composition and antimicrobial activity of essential oil of *Satureja montana* L. Collected in Serbia and Montenegro. *Journal of Essential Oil Research*, 17(4), 462–465.
39. Bezić, N., Skočibušić, M., Dunkić, V. (2005). Phytochemical composition and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. and *Satureja cuneifolia* Ten. essential oils. *Acta Botanica Croatica*, 64, 313- 322.
40. Bhandari, B. R., D'Arc, B. R., Thi Bich, L. L. (1998). Lemon oil to  $\beta$ -Cyclodextrin ratio effect on the inclusion efficiency of  $\beta$ -Cyclodextrin and the retention of oil volatiles in the complex. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1494–1499.
41. Blanco-Pascual, N., Montero, M.P., Gómez-Guillén, M.C. (2014). Antioxidant film development from unrefined extracts of brown seaweeds *Laminaria digitata* and *Ascophyllum nodosum*. *Food Hydrocolloids*, 37, 100–110.
42. Bonilla, J., Atarés, L., Vargas, M., Chiralt, A. (2012). Effect of essential oils and homogenization conditions on properties of chitosan-based films. *Food Hydrocolloids*, 26, 9-16.
43. Bonilla, J., Talón, E., Atarés, L., Vargas, M., Chiralt, A. (2013). Effect of the incorporation of antioxidants on physicochemical and antioxidant properties of wheat starch–chitosan films. *Journal of Food Engineering*, 118, 271–278.

44. Botre, D. A., Soares, N.F. F., Espitia, P. J. P., Sousa, S. de, Renhe, I. R. T. (2010). Avaliação de filme incorporado com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta. *Revista Ceres*, 57(3), 283-291.
45. Bourtoom, T. (2008). Review Article Edible films and coating: characteristics and properties. *International Food Research Journal*, 15, 237–248.
46. Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Simin, N., Anackov, G. (2006). Characterization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1822–1828.
47. Brault, D., Daprano, G., Lacroix, M. (1997). Formation off re-standing sterilised edible films from irradiated caseinates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2664–2969.
48. Bruns CJ. (2019). Exploring and exploiting the symmetry-breaking effect of cyclodextrins in mechanomolecules. *Symmetry*, 11(10):1249.
49. BS EN 1186-1 (2002). Materials and articles in contact with foodstuffs — Plastics. British Standard, UK.
50. Bučko, S., Katona, J., Popović, Lj., Petrović, L., Milinković, J. (2016). Influence of enzymatic hydrolysis on solubility, interfacial and emulsifying properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 60, 271-278.
51. Bučko, S., Katona, J., Popović, Lj., Vaštag, Ž., Petrović, L., Vučinić-Vasić, M. (2015). Investigation on solubility, interfacial and emulsifying properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate. *LWT - Food Science and Technology*, 64 (2), 609-615.
52. Bulut, S., Lazić, V., Popović, S., Hromiš, N., Šuput, D. (2017a). Influence of storage period on properties of biopolymer packaging materials and pouches. *Acta Periodica Technologica*, 48, 53–62.
53. Bulut, S., Lazić, V., Popović, S., Hromiš, N., Šuput, D. (2017b). Influence of different concentrations of glycerol and guar-xanthan on properties of PuOC-Zein bi-layer film. *Field and Vegetable Crops Research*, 54(1), 19–24.
54. Bulut, S., Lazić, V., Popović, S., Hromiš, N., Šuput, D. (2017c). Mono- and bilayer biopolymer films: Synthesis and characterization. *Journal on Processing and Energy in Agriculture*, 21(4), 214–218.
55. Bulut, S., Lazić, V., Popović, S., Šuput, D., Hromiš, N., Popović, L. (2016). Possibility to maintain modified atmosphere in pouches made from biopolymer materials. *Proceedings of 3<sup>rd</sup> international congress “Food Technology, Quality and Safety” & 17th international symposium “Feed Technology” (FoodTech 2016), Novi Sad, Serbia, October 23–25, 122–127.*
56. Bungenberg de Jong HG. (1932). *Protoplasma*, 15, 110-73.
57. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 2004, 223–253.
58. Bustos C., R.O., Alberti R., F.V., Matiacevich, S.B. (2016). Edible antimicrobial films based on microencapsulated lemongrass oil. *Journal of Food Science and Technology*, 53, 832–839.
59. Cabaleiro-Lago, C., García-Río, L., Hervés, P., Mejuto, J. C., Pérez-Juste, J. (2006). Characterization of alkane diol-CD complexes. Acid denitrosation of N-methyl-N-nitroso-p-toluenesulphonamide as a chemical probe. *Journal of Inclusion Phenomena*, 54(3–4), 209–216.
60. Campos, C.A., Gerschenson, L.N., Flores, S.K. (2011). Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 849–875.

61. Capelezzo, A.P., Mohr, L.C., Dalcanton, F., De Mello, J.M.M., Fiori, M.A. (2018)  $\beta$ -cyclodextrins as encapsulating agents of essential oils (Chapter 7). In: Poonam Arora (Ed.). Cyclodextrin - A Versatile Ingredient. IntechOpen, London, England.
62. Cevallos, P.A.P., Buera, M.P., Elizalde, B.E. (2010). Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in  $\beta$ -cyclodextrin: Effect of interactions with water on complex stability. *Journal of Food Engineering*, 99 (1), 70-75.
63. Chen, G., Liu, B. (2016). Cellulose sulfate based film with slow-release antimicrobial properties prepared by incorporation of mustard essential oil and  $\beta$ -cyclodextrin. *Food Hydrocolloids*, 55, 100–107.
64. Chen, H., Li, L., Ma, Y., McDonald, T.P., Wang, Y. (2019). Development of active packaging film containing bioactive components encapsulated in  $\beta$ -cyclodextrin and its application. *Food Hydrocolloids*, 90, 360-366.
65. Cheng, L.H., Karim A., Seow, C.C. (2008). Characterization of composite films made of konjac glucomannan (KGM), carboxymethyl cellulose (CMC) and lipid. *Food Chemistry*, 107, 411-418.
66. Chinabark, K. (2005). Effect of pH, lipids and protein cross linkers on the properties of surimi film from tropical fish. M.Sc. thesis, Prince of Songkla University.
67. Chiumarelli, M., Hubinger, M.D. (2012). Stability, solubility, mechanical and barrier properties of cassava starch: carnauba wax edible coatings to preserve fresh-cut apples. *Food Hydrocolloids*, 28, 59–67.
68. Choi, M.J., Soottitantawat, A., Nuchuchua, O., Min, S.G., Ruktanonchai, U. (2009). Physical and light oxidative properties of eugenol encapsulated by molecular inclusion and emulsion–diffusion method. *Food Research International*, 42, 148–156.
69. Choi, W.S., Singh, S., Lee, Y.S. (2016). Characterization of edible film containing essential oils in hydroxypropyl methylcellulose and its effect on quality attributes of “Formosa” plum (*Prunus salicina* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 70, 213-222.
70. Chorianopoulos, N., Kalpoutzakis, E., Aligiannis, N., Mitaku, S., Nychas, G.J., Haroutounian, S.A. (2004). Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species: Chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, pp. 8261–8267.
71. Chung, J.W., Kim, S.H., Jung, S.J., Kwak, S.Y. (2009). Encapsulation of beta-cyclodextrin by in situ polymerization with vinyl chloride leading to suppressing the migration of endocrine disrupting phthalate plasticizer. *European Polymer Journal*, 45, 2164–2171.
72. Coles, R., McDowell, D., Kirwan, M. (2003). *Food packaging technology*, Blackwell publishing Ltd., Oxford, UK.
73. Cui, H., Bai, M., Lin, L. (2018). Plasma-treated poly(ethylene oxide) nanofibers containing tea tree oil/ $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex for antibacterial packaging. *Carbohydrate Polymers*, 179, 360–369.
74. Cuq, B., Gontard, N., Guilbert, S. (1998). Proteins as agricultural polymers for packaging production. *Cereal Chemistry*, 75, 1–9.

75. Čakarević, J., Šeregelj, V., Tumbas Šaponjac, V., Četković, G., Čanadanović Brunet, G., Popović, S., Hadnađev Kostić, M., Popović, Lj. (2020). Encapsulation of beetroot juice: a study on the application of pumpkin oil cake protein as new carrier agent. *Journal of Microencapsulation*, 37 (2), 121-133.
76. Ćavar Zeljović, S., Topčagić, A., Požgan, F., Štefane, B., Tarkowski, P., Maksimović, M. (2015). Antioxidant activity of natural and modified phenolic extracts from *Satureja montana* L.. *Industrial Crops and Products*, 76, 1094–1099.
77. Ćavar, S., Maksimović, M., Šolić, M.E., Jerković-Mujkić, A., Bešta, R. (2008). Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. *Food Chemistry*, 111, 648–653.
78. Ćavar, S., Šolić, M. E., Maksimović, M. (2013). Chemical composition and antioxidant activity of two *Satureja* species from Mt. Biokovo. *Botanica Serbica*, 37, 159-165.
79. da Rocha Neto, A.C., de Oliveira da Rocha, A.B, Maraschin, M., Di Piero, R.M., Almenar, E. (2018). Factors affecting the entrapment efficiency of  $\beta$ -cyclodextrins and their effects on the formation of inclusion complexes containing essential oils. *Food Hydrocolloids*, 77, 509-523.
80. Dal Pozzo, M., Santurio, D.F., Rossatto, L., Vargas, A.C., & Alves, S.H. (2011). Activity of essential oils from spices against *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis. *Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science*, 63, 1229–32.
81. Dashipour, A., Razavilar, V., Hosseini, H., Shojaee-Aliabadi, S., Bruce German, J., Ghanati, K., Khakpour, M., Khaksar, R. (2015). Antioxidant and antimicrobial carboxymethyl cellulose films containing *Zataria multiflora* essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 606–613.
82. Davies, N. W. (1990). Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicon and Carbowax 20M phases. *Journal of Chromatography A*, 503, pp. 1–24.
83. De Castro, D.O., Tabary, N., Martel, B., Gandini, A., Belgacem, N., Bras, J. (2018). Controlled release of carvacrol and curcumin: Bio-based food packaging by synergism action of TEMPO-oxidized cellulose nanocrystals and cyclodextrin. *Cellulose*, 25, 1249–1263.
84. De Oliveira, T.L.C, Malfitano de Carvalho, S., de Araújo Soares, R., Andrade, M.A., Cardoso, M., das G, Ramos EM, Piccoli, R.H., (2012). Antioxidant effects of *Satureja montana* L. essential oil on TBARS and color of mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. *LWT - Food Science and Technology*, 45(2), 204–212.
85. De Oliveira, T.L.C., de Araújo Soares, R., Ramos, E.M., das Graças Cardoso, M., Alves E, Piccoli RH. (2011). Antimicrobial activity of *Satureja montana* L. essential oil against *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. *International Journal of Food Microbiology*, 144(3), 546–555.
86. Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J.A., Voilley, A. (1998). Edible films and coatings: Tomorrow's packagings: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 299–313.
87. Deeseenthum, S., Pejović, J. (2010). Bacterial Inhibition and Antioxidant Activity of Kefir Produced from Thai Jasmine Rice Milk. *Biotechnology* 9 (3), 332-337.
88. Del Valle, E. (2004). Cyclodextrins and their uses: A review. *Process Biochemistry*, 39(9), 1033–1046.
89. Demetzos, C., Angelopoulou, D., Perdetzoglou, D. (2002). A comparative study of the essential oils of *Cistus salvifolius* in several populations of Crete (Greece). *Biochemical Systematics and Ecology*, 30, 651-665.



90. Desai, K.G.H, Park, H.J. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23, 1361-1394.
91. Dias Antunes, M., da Silva Dannenberg, G., Fiorentini, Â.M., Pinto, V.Z., Lim, L.T., da Rosa Zavareze, E., Dias, A.R.G. (2017). Antimicrobial electrospun ultrafine fibers from zein containing eucalyptus essential oil/cyclodextrin inclusion complex. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 874–882.
92. Djenane, D., Yangüela, J., Montañés, L., Djerbal., M., Roncalés, P. (2011). Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: Efficacy and synergistic potential in minced beef. *Food Control*, 22(7), 1046–1053.
93. Dorrego, A.B., García-Río, L., Hervés, P., Leis, J.R., Mejuto, J.C., Pérez-Juste, J. (2000). Micellization versus cyclodextrin–surfactant complexation. *Angewandte Chemie*, 39(16), 2945–2948.
94. Đorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., Kostić, I., Komes, D., Bugarski, B., Nedović, V. (2015). Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. *Food Engineering Reviews*, 7, 452–490.
95. Embuscado, M.E., Huber, K.C. (2009). *Edible Films and Coatings for Food Applications*. Springer Science+Business Media, LLC.
96. Emiroğlu, Z. K., Yemiş, G. P., Coşkun, B. K., Candoğan, K. (2010). Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Science*, 86(2), 283-288.
97. European Commission. (2004). Commission Regulation 1935/2004 of October 2004 on materials and articles intended to come into contact with food and repealing Directives 80/590/EEC and 89/109/EEC. *European Economic Community Official Journal* European Union.
98. Fang, Z., Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols – A review. *Trends in Food Science and Technology*, 21, 510–523.
99. Fasihi, H., Noshirvani, N., Hashemi, M., Fazilati, M., Salavati, H., Coma, V. (2019). Antioxidant and antimicrobial properties of carbohydrate-based films enriched with cinnamon essential oil by Pickering emulsion method. *Food Packaging and Shelf Life*, 19, 147–154.
100. Feng, K., Wen, P., Yang, H., Li, N., Lou, W.J., Zong, M.H., Wu, H. (2017). Enhancement of the antimicrobial activity of cinnamon essential oil-loaded electrospun nanofilm by the incorporation of lysozyme. *RSC Advances*, 7, 1572–1580.
101. Fernandez Cervera, M., Karjalainen, M., Airaksinen, S., Rantanen, J., Krogars, K., Heinamaki, J., Iraizoz Colarte, A., Yliruusi, J. (2004). Physical stability and moisture sorption of aqueous chitosan–amylose starch films plasticized with polyols. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58, 69–76.
102. Fernández, I., García-Río, L., Hervés, P., Mejuto, J. C., Pérez-Juste, J., Rodríguez-Dafonte, P. J. (2000).  $\beta$ -Cyclodextrin-micelle mixed systems as a reaction medium. Denitrosation of N-methyl-N-nitroso-ptoluenesulfonamide. *Physical Organic Chemistry*, 13, 664–669.
103. Filip, S. (2014). Ekstrakcija bosiljka (*Ocimum basilicum*, *Lamiaceae*) ugljendioksidom u superkritičnom stanju i modelovanje ekstrakcionog Sistema. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad.

104. Filip, S., Vidović, S., Adamović, D., Zeković, Z. (2014). Fractionation of non-polar compounds of basil (*Ocimum basilicum* L.) by supercritical fluid extraction (SFE). *The Journal of Supercritical Fluids*, 86:85–90.
105. Fratini, F., Casella, S., Leonardi, M., Pisseri, F., Ebani, V.V., Pistelli, L., Pistelli, L. (2014). Antibacterial activity of essential oils, their blends and mixtures of their main constituents against some strains support ing livestock mastitis. *Fitoterapia*, 96, 1–7.
106. Friné, V.C., Hector, A.P. Manuel, N.D.S. Estrella, N.D. Antonio, G.J. (2019). Development and characterization of a biodegradable PLA food packaging hold monoterpene–cyclodextrin complexes against *Alternaria alternata*. *Polymers* 2019, 11, 1720.
107. Fuenmayor, C.A., Mascheroni, E., Cosio, M.S., Piergiovanni, L., Benedetti, S., Ortenzi, M., Schiraldi, A., Mannino, S. (2013). Encapsulation of R(+)-limonene in edible electrospun nanofibers. *Chemical engineering transactions*, 32, 1771–1776.
108. Gadosy, T.A., Boyd, M.J., Tee, O.S. (2000). Catalysis of ester aminolysis by cyclodextrins. The reaction of alkylamines with p-nitrophenyl alkanoates. *Journal of Organic Chemistry*, 65(21), 6879–6889.
109. Gao, C., Stading, M., Wellner, N., Parker, M.L., Noel, T.R., Mills, E.N.C., Belton, P.S. (2006). Plasticization of a protein-based film by glycerol: a spectroscopic, mechanical, and thermal study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4611–4616.
110. Gaonkar, A.G., Vasisht, N., Khare, A.R., Sobel, R. (2014). *Microencapsulation in the Food Industry. A Practical Implementation Guide*. Academic Press, Elsevier, San Diego, CA, United States.
111. García-Río, L., Hall, R. W., Mejuto, J. C., Rodríguez-Dafonte, P. (2007). The solvolysis of benzoyl halides as a chemical probe determining the polarity of the cavity of dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Tetrahedron*, 63(10), 2208–2214.
112. García-Río, L., Hervés, P., Leis, J. R., Mejuto, J. C., Pérez-Juste, J., Rodríguez-Dafonte, P. (2006). Evidence for complexes of different stoichiometries between organic solvents and cyclodextrins. *Organic Biomolecular Chemistry*, 4, 1038–1048.
113. Garcia-Rio, L., Leis, J. R., Mejuto, J. C., Navarro-Vazquez, A., Perez-Juste, J., Rodriguez-Dafonte, P. (2004). Basic hydrolysis of crystal violet in  $\beta$ -cyclodextrin/surfactant mixed systems. *Langmuir*, 20, 606–613.
114. García-Río, L., Mejuto, J. C., Nieto, M., Pérez-Juste, J., Pérez-Lorenzo, M., Rodríguez-Dafonte, P. (2005). Denitrosation of N-nitrososulfonamide as chemical probe for determination of binding constants to cyclodextrins. *Supramolecular Chemistry*, 17(8), 649–653.
115. García-Río, L., Mejuto, J. C., Rodríguez-Dafonte, P., Hall, R. W. (2010). The role of water release from the cyclodextrin cavity in the complexation of benzoyl chlorides by dimethyl-b-cyclodextrin. *Tetrahedron*, 66 (13), 2529-2537.
116. Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G., Georgakis, S.A. (2007). Effect of rosemary extract, chitosan and a-tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. *Meat Science*, 76, 172–181.
117. Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Montero, P. (2010). Biodegradable gelatine-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 27(7), 889-896.

118. Green BK, Schleicher L. (1957). Oil-containing microscopic capsules and method of making. Them. US Patent 2800457.
119. Grieu, S., Faugeroux, O., Traoré, A., Claudet, B., Bodnar, J. L. (2011). Artificial intelligence tools and inverse methods for estimating the thermal diffusivity of building materials. *Energy and Buildings*, 43, 543-554.
120. Guillén, M.D., Cabo, N. (1997). Infrared spectroscopy in the study of edible oils and fats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75(1), 1–11.
121. Guillén, M.D., Cabo, N. (2004). Study of the effects of smoke flavourings on the oxidative stability of the lipids of pork adipose tissue by means of Fourier transform infrared spectroscopy. *Meat Science*, 66(3), 647–657.
122. Guimaraes, A.G., Oliveira, M.A., Alves, R.S., Menezes, P.P., Serafini, M.R., Araujo, A.A.S., Bezerra, D.P., Junior, L.J.Q. (2015). Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with  $\beta$ -cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental. *Chemico-Biological Interactions*, 227, 69–76.
123. Hafsa, J., Smach, M. ali, Khedher, M.R.B., Charfeddine, B., Limem, K., Majdoub, H., Rouatbi, S. (2016). Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing *Eucalyptus globulus* essential oil, *LWT - Food Science and Technology*, 68, 356-364.
124. Halliwell, B., Murcia, M.A., Chirico, S., Aruoma O.I. (1995). Free radicals and antioxidants in food and in vivo: What they do and how they work. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35, 7-20.
125. Han, Y., Yu, M., Wang, L. (2018). Preparation and characterization of antioxidant soy protein isolate films incorporating licorice residue extract. *Food Hydrocolloids*, 75, 13–21.
126. Hasheminya, S.M., Mokarram, R.R., Ghanbarzadeh, B., Hamishekar, H., Kafil, H.S., Dehghannya, J. (2019). Development and characterization of biocomposite films made from kefiran, carboxymethyl cellulose and *Satureja Khuzestanica* essential oil. *Food Chemistry*, 289, 443–52.
127. Hernández-Muñoz, P., Villalobos, R., Chiralt, A. (2004). Effect of cross-linking using aldehydes on properties of glutenin-rich films. *Food Hydrocolloids*, 18 (3), 403-411.
128. Herrera, A., Rodríguez, F.J., Bruna, J.E., Abarca, R.L., Galotto, M.J., Guarda, A., Mascayano, C., Sandoval-Yáñez, C., Padula, M., Felipe, F.R.S. (2019). Antifungal and physicochemical properties of inclusion complexes based on  $\beta$ -cyclodextrin and essential oil derivatives. *Food Research International*, 121, 127–135.
129. Higuera, H., López-Carballo, G., Cerisuelo, J.P., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P. (2013). Preparation and characterization of chitosan/HP- $\beta$ -cyclodextrins composites with high sorption capacity for carvacrol. *Carbohydrate Polymers*, 97, 262– 268.
130. Higuera, L., López-Carballo, G., Hernández-Muñoz, P., Catalá, R., Gavara, R. (2014). Antimicrobial packaging of chicken fillets based on the release of carvacrol from chitosan/cyclodextrin films. *International Journal of Food Microbiology*, 188, 53–59.
131. Hill, L.E., Gomes, C., Taylor, M. (2013). Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. *LWT - Food Science and Technology*, 51 (1), 86-93.

132. Hosseini, M.H., Razavi, S.H., Mousavi, M.A. (2009). Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan-based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils. *Journal of Food Processing and Preservation*, 33, 727–743.
133. Hosseini, S.F., Rezaei, M., Zandi, M., Farahmandghavi, F. (2015). Bio-based composite edible films containing *Origanum vulgare* L. essential oil. *Industrial Crops and Products* 67, 403–413.
134. Hromiš, N. (2015). Razvoj biorazgradivog aktivnog ambalažnog materijala na bazi hitozana: sinteza, optimizacija svojstava, karakterizacija i primena. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad.
135. Hussain, A.I., Anwar, F., Hussain Sherazi, S.T., Przybylski, R. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*, 108, 986–995.
136. Iglesias, E. (2003). Nitrosation of 2-acetylcyclohexanone. 2. Reaction in water in the absence and presence of cyclodextrins. *Journal Organic Chemistry*, 68, 2689–2697.
137. Inoue, Y., Hakushi, T., Liu, Y., Tong, L., Shen, B., Jin, D. (1993). Thermodynamics of molecular recognition by cyclodextrins. 1. Calorimetric titration of inclusion complexation of naphthalenesulfonates with .alpha.-, .beta.-, and .gamma.-cyclodextrins: enthalpy-entropy compensation. *Journal of the American Chemical Society*, 115 (2), 475–481.
138. ISO 2528 (1995). Sheet materials -Determination of water vapour transmission rate - Gravimetric (dish) method. International Organisation for Standardisation, Switzerland.
139. Iturriaga, L., Olabarrieta, I., De Marañón, I.M. (2012). Antimicrobial assays of natural extracts and their inhibitory effect against *Listeria innocua* and fish spoilage bacteria, after incorporation into biopolymer edible films. *International Journal of Food Microbiology*, 158 (1), 58–64.
140. Jabir, M.S., Taha, A.A., Sahib, U.I. (2018). Antioxidant activity of linalool. *Engineering and Technology Journal*, 36 (1), 64-67.
141. Jelačić, S.Ć., Beatović, D.V., Prodanović, S.A., Tasić, S.R., Moravčević, D.Ž., Vujošević, A.M., Vučković, A.M. (2011). Hemijski sastav etarskog ulja bosiljka (*Ocimum basilicum* L. Lamiaceae). *Hemijska Industrija*, 65(4), 465–471.
142. Joo, M.J., Merkel, C., Auras, R., Almenar, E. (2012). Development and characterization of antimicrobial poly(L-lactic acid) containing trans-2-hexenal trapped in cyclodextrins. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 297–305.
143. Jooyandeh, H. (2011). Whey protein films and coatings: A review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 10 (3), 296-301.
144. Jouki, M., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., Koocheki, A. (2014). Quince seed mucilage films incorporated with oregano essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. *Food Hydrocolloids*, 36, 9-19.
145. Kalagatur, N.K., Nirmal Ghosh, O.S., Sundararaj, N., Mudili, V. (2018). Antifungal activity of chitosan nanoparticles encapsulated with *Cymbopogon martinii* essential oil on plant pathogenic fungi *Fusarium graminearum*. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1–13.
146. Kamimura, J.A., Santos, E.H., Hill, L.E., Gomes, C.L. (2014). Antimicrobial and antioxidant activities of carvacrol microencapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *LWT - Food Science and Technology*, 57, 701-709.

147. Katona, J. (2017). Mikrokapsulirani sistemi. Praktikum, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad, Srbija.
148. Kayaci, F., Sen, H.S., Durgun, E., Uyar, T. (2014). Functional electrospun polymeric nanofibers incorporating geraniol-cyclodextrin inclusion complexes: High thermal stability and enhanced durability of geraniol. *Food Research International*, 62, 424–431.
149. Kayaci, F., Umu, O.C.O., Tekinay, T., Uyar, T. (2013). Antibacterial electrospun poly(lactic acid) (PLA) nanofibrous webs incorporating triclosan/cyclodextrin inclusion complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 3901–3908.
150. Kayaci, F., Uyar, T. (2011). Solid inclusion complexes of vanillin with cyclodextrins: Their formation, characterization, and high-temperature stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 11772–11778.
151. Kelm, M.A., Nair, M.G., Strasburg, G.M., DeWitt, D.L. (2000). Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory phenolic compounds from *Ocimum sanctum* Linn. *Phytomedicine*, 7 (1), 7-13.
152. Khalili, S.T., Mohsenifar, A., Beyki, M., Zhavah, S., Rahmani-Cherati, T., Abdollahi, A., Bayat, M., Tabatabaei, M. (2015). Encapsulation of Thyme essential oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *LWT - Food Science and Technology*, 60(1), 502–508.
153. Kinsella, J.E. (1984). Milk proteins: Physicochemical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 21, 197–262.
154. Kollo, T., von Rosen, D. (2005). *Advanced Multivariate Statistics with Matrices*. Springer, Dordrecht.
155. Kong, M., Chen, X.G., Xing, K., Park, H.J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 51–63.
156. Koontz, J.L., Marcy, J.E. (2007). Controlled release of active ingredients from polymer food packaging by molecular encapsulation with cyclodextrins. *Polymer Preprints (American Chemical Society, Division of Polymer Chemistry)*, 48, 742.
157. Koontz, J.L., Marcy, J.E., O’Keefe, S.F., Duncan, S.E., Long, T.E., Moffitt, R.D. (2010). Polymer processing and characterization of LLDPE films loaded with alpha-tocopherol, quercetin, and their cyclodextrin inclusion complexes. *Journal of Applied Polymer Science*, 117, 2299–2309.
158. Korycka-Dahl, M., Richardson, T. (1980). Initiation of oxidative changes in foods. *Journal of Dairy Science*, 63 (7), 1181-1198.
159. Lacroix, M., Vu, K.D. (2014). Edible coating and film materials: proteins. In: Han, J.H. (Ed). *Innovations in Food Packaging*, Academic Press, San Diego, CA, United States, pp. 277–294.
160. Lahcene, A., Madi, F., Nouar, L., Cherait, M., Merabet, N., Khatmi, Dj. (2016). Computational study of inclusion complexes formation between carvacrol and  $\beta$ -cyclodextrin in vacuum and in water: Charge transfer, electronic transitions and NBO analysis. *Journal of Molecular Liquids*, 224, 62-71.
161. Lambert, R., Skandamis, P., Coote, P., Nychas, G. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 91: 453-462.

162. Lavoine, N., Givord, C., Tabary, N., Desloges, I., Martel, B., Bras, J. (2014). Elaboration of a new antibacterial bio-nano-material for food-packaging by synergistic action of cyclodextrin and microfibrillated cellulose. *IFSET*, 26, 330–340.
163. Lazić, V., Gvozdenović, J., Petrović, T. (2008). Mogućnost savremenog pakovanja hrane. *Časopis za Procesnu Tehniku i Energetiku u Poljoprivredi „PTEP“*, 12 (1-2), 49-52.
164. Lazić, V., Novaković, D. (2010). Ambalaža i životna sredina. Monografija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad, Srbija.
165. Lazić, V., Popović, S. (2015). Biorazgradivi ambalažni materijali. Monografija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad, Srbija.
166. Leal, P.F., Chaves, F.C.M., Ming, L.C., Petenate, A.J., Meireles, M.A.A. (2006). Global yields, chemical composition, antioxidant activities of clove basil (*Ocimum gratissimum* L.) extracts obtained by supercritical fluid extraction. *J. of Food Process Eng.*, 29 (5), 547-559.
167. Leal, P.F., Maia, N.B., Carmello, Q.A.C., Catharino, R.R., Eberlin, M.N., Meireles, M.A.A. (2008). Sweet basil (*Ocimum basilicum*) extracts obtained by supercritical fluid extraction (SFE): Global yields, chemical composition, antioxidant activity, and estimation of the cost of manufacturing. *Food and Bioprocess Tech.*, 1 (4), 326-338.
168. Leboffe, J.M., Pierce, L.B. (2005). *A Photographic Atlas Microbiology Laboratory*. Morton Publishing Company, Englewood, CO, pp. 89–91.
169. Letendre, M., D’Aprano, G., Lacroix, M., Salmieri, S., Gelais, S.D. (2002). Physicochemical properties and bacterial resistance of biodegradable milk protein films containing agar and pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6017–6022.
170. Li, M., Zhang, F., Liu, Z., Guo, X., Wu, Q., Qiao, L. (2018). Controlled release system by active gelatin film incorporated with  $\beta$ -cyclodextrin-thymol inclusion complexes. *Food and Bioprocess Technology*, 11, 1695–1702.
171. Li, Y., Lai, P., Chen, J., Shen, H., Wu, L., Tang, B. (2015). Physicochemical and antioxidant properties of spray drying powders from *Stropharia rugoso-annulata* and *Agaricus brunnescens* blanching liquid. *Advanced Journal of Food Science and Technology*, 9, 372-378.
172. Limpisophon, K., Tanaka, M., Osako, K. (2010). Characterisation of gelatin–fatty acid emulsion films based on blue shark (*Prionace glauca*) skin gelatin. *Food Chemistry*, 122 (4), 1095–1101.
173. Llana-Ruiz-Cabello, M., Gutiérrez-Praena, D., Puerto, M., Pichardo, S., Jos, Á., Cameán, A.M. (2015). In vitro pro-oxidant/antioxidant role of carvacrol, thymol and their mixture in the intestinal Caco-2 cell line. *Toxicology in Vitro*, 29, 647–656.
174. López-de-Dicastillo, C., Catalá, R., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P. (2011b). Food applications of active packaging EVOH films containing cyclodextrins for the preferential scavenging of undesirable compounds. *Journal of Food Engineering*, 104, 380–386.
175. Lopez-de-Dicastillo, C., Gallur, M., Catala, R., Gavara, R., Hernandez-Munoz, P. (2010). Immobilization of beta-cyclodextrin in ethylene-vinyl alcohol copolymer for active food packaging applications. *Journal of Membrane Science*, 353, 184–191.
176. Lopez-de-Dicastillo, C., Jorda, M., Catala, R., Gavara, R., Hernandez-Munoz, P. (2011a). Development of active polyvinyl alcohol/beta-cyclodextrin composites to scavenge undesirable food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 11026–11033.

177. Mahdi Ojagh, S., Rezaei, M., Razavi, S.H., Hosseini, S.M.H. (2010). Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry*, 122, 161–166.
178. Mallardo, S., De Vito, V., Malinconico, M., Volpe, M.G., Santagata, G., Di Lorenzo, M.L. (2016). Poly(butylene succinate)-based composites containing  $\beta$ -cyclodextrin/d-limonene inclusion complex. *European Polymer Journal*, 79, 82–96.
179. Manakker, F., Vermond, T., Vans Nostrum, C.F., Hennink, W.E., van de Manakker, F. (2009). Cyclodextrin - based polymeric materials: Synthesis, properties, and pharmaceutical/biomedical applications. *Biomacromolecules*, 10(12), 3157–3174.
180. Marques, H.M.C. (2010). A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5), 313–326.
181. Marsh, K., Bugusu, B. (2007). Food Packaging-Roles, Materials and Environmental Issues. *Journal of Food Science*, 72 (3), 39-55.
182. Martucci, J.F., Gende, L.B., Neira, L.M., Ruseckaite, R.A. (2015). Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. *Industrial Crops and Products*, 71, 205–213.
183. Martucci, J. F., & Ruseckaite, R. A. (2010). Biodegradable threelayerfilm derived from bovine gelatin. *Journal of Food Engineering*, 99(3), 377–383.
184. Maryam Adilah, Z.A., Nur Hanani, Z.A. (2019). Storage stability of soy protein isolate films incorporated with mango kernel extract at different temperature. *Food Hydrocolloids*, 87, 541–549.
185. Melo, A.A.M. De, Geraldine, R.M., Silveira, M.F.A., Lopes, M.C., Silva, C., Fernandes, T.H., de Oliveira, A.N. (2012). Microbiological quality and other characteristics of refrigerated chicken meat in contact with cellulose acetate-based film incorporated with rosemary essential oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1419-1427.
186. Miladi, H., Mili, D., Ben Slama, R., Zouari, S., Ammar, E., Bakhrouf, A. (2016). Antibiofilm formation and anti-adhesive property of three mediterranean essential oils against a foodborne pathogen *Salmonella* strain. *Microbial Pathogenesis*, 93, 22–31.
187. Montañó, J.J. Palmer, A. (2003). Numeric sensitivity analysis applied to feedforward neural networks. *Neural Comput and Appllic*, 12, 119-125.
188. Montgomery, D. C. (1984). *Design and Analysis of Experiments: Graph. Darst.* Wiley.
189. Moosavy, M.H., Akhondzadeh Basti, A., Misaghi, A., Zahraei Salehi, T., Abbasifar, R., Ebrahimzadeh Mousavi, H.A., Alipour, M., Emami Razavi, N., Gandomi, H., Noori, N. (2008). Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in a food model system and on the bacterial cell membranes. *Food Research International*, 41, 1050–1057.
190. Moradi, M., Tajik, H., Rohani, S.M.R., Oromiehie, A.R., Malekinejad, H., Aliakbarlu, J., Hadian, M. (2012). Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. *LWT -Food Science and Technology*, 46, 477-484.
191. Morales, F.J., Jimenez-Perez, S. (2001). Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chemistry*, 72 (1), 119–125.

192. Munhuweyi, K., Caleb, O.J., van Reenen, A.J., Opara, U.L. (2018). Physical and antifungal properties of  $\beta$ -cyclodextrin microcapsules and nanofibre films containing cinnamon and oregano essential oils. *LWT - Food Science and Technology*, 87, 413–422.
193. Mura, P. (2014). Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 101, 238–250.
194. Murarikova, A., Tažky, A., Neugebauerova, J., Alexandra Plankova, A., Jampilek, J., Mučaji, P., Mikuš P. (2017). Characterization of essential oil composition in different basil species and pot cultures by a GC-MS method. *Journal Molecules*, 22, 1221.
195. Natrajan, N., Sheldon, B.W. (2000). Efficacy of nisin-coated polymer films to inactivate *Salmonella typhimurium* on fresh broiler skin. *Journal of Food Protection*, 63, 1189–1196.
196. Navarro, R., Arancibia, C., Herrera, M.L., Matiacevich, S. (2016). Effect of type of encapsulating agent on physical properties of edible films based on alginate and thyme oil. *Food and Bioproducts Processing*, 97, 63-75.
197. Neoh, T.L., Ariyanto, H.D., Menéndez Galvan, P., Yoshii, H. (2017). Controlled release of 1-methylcyclopropene from its functionalised electrospun fibres under constant and linearly ramped humidity. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 34, 1690–1702.
198. Norajit, K., Kim, K.M., Ryu, G.H. (2010). Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. *Journal of Food Engineering*, 98, 377–384.
199. Ohshima, H., Yoshie, Y., Auriol, S., Gilbert, I. (1998). Antioxidant and pro-oxidant actions of flavanoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxyl anion. *Free Radical Biology & Medicine*, 25 (9), 1057–1065.
200. Oke, F., Aslim, B., Ozturk, S., Altundag, S. (2009). Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *Food Chemistry*, 112 (4), 874-879.
201. Oussalah, M., Laroix, M. (2006). Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 69, 1046–1055.
202. Ozkan, G., Franco, P., De Marco, I., Xiao, J., Capanoglu, E. (2019). A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications. *Food Chemistry*, 272, 494-506.
203. Park, S.K., Hettiarachchy, N.S., Ju, Z.Y., Gennadios, A. (2002). Formation and properties of soy protein film and coatings. In: Gennadios, A. (Ed.), *Protein-Based Films and Coatings*. CRC Press, Boca Raton, FL, United States, pp. 123–137.
204. Patel, P. (2017). Formulation, development and evaluation of rivaroxaban tablets by using solubility enhancement technique. *International Journal of Pharma Sciences and Scientific Research*, 3(3), 51-55.
205. Peng, Y., Li, Y. (2014). Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films. *Food Hydrocolloids*, 36, 287-293.
206. Pérez-Gago, M.B., Rhim, J.W. (2014). Edible coating and film materials: Lipid bilayers and lipid emulsions. In: Han, J.H., (Ed). *Innovations in Food Packaging*, Packaging Academic Press, Elsevier, San Diego, CA, United States, pp. 325–350.



207. Petrou, S., Tsiraki, M., Giatrakou, V., Savvaidis, I.N. (2012). Chitosan dipping or oregano oil treatments, singly or combined on modified atmosphere packaged chicken breast meat. *International Journal of Food Microbiology*, 156, 264–271.
208. Pezo, L.L., Ćurčić, B.Lj., Filipović, V.S., Nićetin, M.R., Koprivica, G.B., Mišljenović, N.M., Lević, Lj.B. (2013). Artificial neural network model of pork meat cubes osmotic dehydration. *Hemijska Industrija*, 67 (3) 465–47.
209. Piletti, R., Bugiereck, A.M., Pereira, A.T., Gussati, E., Dal Magro, J., Mello, J.M.M., Dalcanton, F., Ternus, R.Z., Soares, C., Riella, H.G., Fiori, M.A. (2017). Microencapsulation of eugenol molecules by  $\beta$ -cyclodextrine as a thermal protection method of antibacterial action. *Materials Science and Engineering C*, 75, 259–271.
210. Pinho, E., Grootveld, M., Soares, G., Henriques, M. (2014). Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydrate Polymers*, 101, 121-135.
211. Pires, C., Ramos, C., Teixeira, B., Batista, I., Nunes, M.L., Marques, A. (2013). Hake proteins edible films incorporated with essential oils: Physical, mechanical, antioxidant and antibacterial properties. *Food Hydrocolloids*, 30 (1), 224–231.
212. Pires, C., Ramos, C., Teixeira, G., Batista, I., Mendes, R., Nunes, L., Marques, A. (2011). Characterization of biodegradable films prepared with hake proteins and thyme oil. *Journal of Food Engineering*, 105 (3), 422–428.
213. Plackett, D., Ghanbari-Siahkali, A., Szenté, L. (2007). Behavior of alpha- and beta-cyclodextrin-encapsulated allyl isothiocyanate as slow-release additives in polylactide-co-polycaprolactone films. *Journal of Applied Polymer Science*, 105, 2850–2857.
214. Plackett, D.V., Holm, V.K., Johansen, P., Ndoni, S., Nielsen, P.V., Sipilainen-Malm, T., Soedergaard, A., Verstichel, S. (2006). Characterization of L-polylactide and L-polylactide-polycaprolactone copolymer films for use in cheese-packaging applications. *Packaging Technology and Science*, 19, 1–24.
215. Pol, I.E., Mastwijk, H.C., Slump, R.A., Popa, M.E., Smid, E.J. (2001). Influence of food matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric field treatment, and carvacrol. *Journal of Food Protection*, 64, (7), 1012–1018.
216. Ponce, A., Fritz, R., del Valle, C., Roura, S. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT – Food Science and Technology*, 36, 679–684.
217. Popović, Lj. (2010). Hydrolysis of pumpkin oil cake globulin-cucurbitin by pepsin; Antioxidant and functional properties of resulting hydrolysates. *Journal of Biotechnology*, 150, 315-315.
218. Popović, S. (2013). Istraživanje dobijanja i karakterizacija biorazgradivih kompozitnih filmova na bazi biljnih proteina. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad.
219. Popović, S., Hromiš, N., Šuput, D., Bulut, S., Romanić, R., Lazić, V. (2020). Valorization of by-products from the production of pressed edible oils to produce biopolymer films (Chapter 3). In: Mohamed Fawzy Ramadan (Ed.). *Cold Pressed Oils – Green Technology, Bioactive Compounds, Functionality, and Applications*. Academic Press, Elsevier, San Diego, CA, United States, 15-30.
220. Popović, S., Hromiš, N., Šuput, D., Bulut, S., Vitas, S., Savić, M., Lazić, V. (2021). Pumpkin seed oil cake/polyethylene film as new food packaging material, with perspective for packing under modified atmosphere. *Packaging Technology and Science*, 34 (1), 25-33.

221. Popović, S., Lazić, V., Hromiš, N., Šuput, D., Bulut, S. (2018). Biopolymer packaging materials for food shelf-life prolongation (Chapter 8). In: Biopolymers for food design, Ed: Grumezescu & Holban, Academic Press, Elsevier, San Diego, CA, United States, pp. 223-277.
222. Popović, S., Lazić, V., Popović, Lj, Vaštag, Ž., Peričin, D. (2010). Effect of the addition of pumpkin oil cake to gelatine to produce biodegradable composite films. *International Journal of Food Science and Technology*, 45 (6), 1184–1190.
223. Popović, S., Peričin, D., Vaštag, Ž., Popović, L., Lazić, V. (2011). Evaluation of edible film-forming ability of pumpkin oil cake; effect of pH and temperature. *Food Hydrocolloids*, 25, 470–476.
224. Poverenov, E., Granit, R., Gabai, S. (2013). Encapsulation and controlled release of antifungal propionic acid utilizing biodegradable active films based on natural polymers. *European Food Research and Technology*, 237, 19–26.
225. Prabu, S., Swaminathan, M., Sivakumar, K., Rajamohan, R. (2015). Preparation, characterization and molecular modeling studies of the inclusion complex of caffeine with beta-cyclodextrin. *Journal of Molecular Structure*, 1099, 616–624.
226. Pranoto, Y. Rakshit, S.K., Salokhe, V.M. (2005). Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT - Food Science and Technology*, 38, 859–865.
227. Prieto, J.M., Iacopini, P., Cioni, P., Chericoni, S. (2007). In vitro activity of the essential oils of *Origanum vulgare*, *Satureja montana* and their main constituents in peroxynitrite-induced oxidative processes. *Food Chemistry*, 104(3), 889–895.
228. Prieto, J.M., Iacopini, P., Cioni, P., Chericoni, S. (2007). In vitro activity of the essential oils of *Origanum vulgare*, *Satureja montana* and their main constituents in peroxynitrite-induced oxidative processes. *Food Chemistry*, 104, 889-895.
229. Pripdeevech, P., Chumpolsri, W., Suttiarporn, P., Wongpornchai, S. (2010). The chemical composition and antioxidant activities of basil from Thailand using retention indices and comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 75 (11), 1503-1513.
230. Rakmai, J., Cheirsilp, B., Mejuto, H.C., Simal-Gándara, J. (2018). Antioxidant and antimicrobial properties of encapsulated guava leaf oil in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Industrial Crops and Products*, 111, 219–225.
231. Ramos, Ó.L., Fernandes, J.C., Silva, S.I., Pintado, M.E., Malcata, F.X. (2012) Edible films and coatings from whey proteins: A review on formulation, and on mechanical and bioactive properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52 (6), 533-552.
232. Ramziia, S., Ma, H., Yao, Y., Wei, K., Huang, Y. (2018). Enhanced antioxidant activity of fish gelatin–chitosan edible films incorporated with procyanidin. *Journal of Applied Polymer Science*, 135 (10), 45781.
233. Rekharsky, M.V., Inoue, Y. (1998). Complexation thermodynamics of cyclodextrins. *Chemical Reviews*, 5, 1875–1917.
234. Rezaee, M., Askari, G., Emam Djomeh, Z., Salami, M. (2018). Effect of organic additives on physicochemical properties and anti-oxidant release from chitosan-gelatin composite films to fatty food simulat. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 844–850.

235. Rhayour, K., Elaraki, T.A., Sendide, K., Remmal, A. (2003). The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Essential Oil Research*, 15, 356–362.
236. Ribeiro-Santos, R., Andrade, M., de Melo, N.R., Sanches-Silva, A. (2017). Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. *Trends in Food Science and Technology*, 61, 132–140.
237. Riquelme, N., Herrera, M.L., Matiacevich, S. (2017). Active films based on alginate containing lemongrass essential oil encapsulated: Effect of process and storage conditions. *Food and Bioproducts Processing*, 104, 94-103.
238. Rivas, L., McDonnell, M. J., Burgess, M. C., O'Brien, M., Navarro-Villa, A., Fanning, S. (2010). Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol. *International Journal of Food Microbiology*, 139, 70-78.
239. Robertson, G.H., Gregorski, K.S., Cao, T.K. (2006). Changes in secondary protein structures during mixing development of high absorption (90%) flour and water mixtures. *Cereal Chemistry*, 83, 136–142.
240. Ruberto, G., Baratta, M.T. (2000). Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*, 69, 167-174.
241. Rubilar, J.F., Cruz, R.M.S., Silva, H.D., Vicente, A.A., Khmelinskii, I., Vieira, M.C. (2013). Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. *Journal of Food Engineering*, 115, 466–474.
242. Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Sendra, E., Perez-Alvarez, J. A., Fernández-López, J. (2013). In vitro antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with *Thymus moroderi* or *Thymus piperella* essential oils. *Food Control*, 30, 386-392.
243. Salgado, P.R., López-Caballero, M.E., Gómez-Guillén, M.C., Mauri, A.N., Montero, M.P. (2013). Sunflower protein films incorporated with clove essential oil have potential application for the preservation of fish patties. *Food Hydrocolloids*, 33 (1), 74–84.
244. Sánchez-González, L., Cháfer, M., Chiralt, A., González-Martínez, C. (2010). Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. *Carbohydrate Polymers*, 82, 277–283.
245. Sánchez-González, L., Cháfer, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., Desobry, S. (2011). Study of the release of limonene present in chitosan films enriched with bergamot oil in food simulants. *Journal of Food Engineering*, 105(1), 138-143.
246. Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., Cháfer, M. (2009). Characterization of edible films based on hydroxypropylmethylcellulose and tea tree essential oil. *Food Hydrocolloids*, 23, 2102–2109.
247. Santos, J., Yoshie-Stark, Y., Suzuki, T. (2004). Anti-oxidant activity of methanol extracts from Indonesian seaweeds in an oil emulsion model. *Fisheries Science*, 70, 183–188.
248. Schmid, M., Müller, K. (2019). Whey protein-based packaging films and coatings (Chapter 11). In: *Whey proteins. From milk to medicine*, Ed: Deeth & Bansal, Academic Press, Elsevier, San Diego, CA, United States, pp. 407-437.

249. Secundo, F. Guerrieri, N. (2005). ATR-FT/IR study on the interactions between gliadins and dextrin and their effects on protein secondary structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1757–1764.
250. Sefidkon F, Jamzad Z. (2005). Chemical composition of the essential oil of three Iranian *Satureja* species (*S. mutica*, *S. macrantha* and *S. intermedia*). *Food Chemistry*, 91(1), 1–4.
251. Sellimi, S., Younes, I., Ben Ayed, H., Maalej, H., Montero, V., Rinaudo, M., Dahia, M., Mechichi, T., Hajji, M., Nasri, M. (2015). Structural, physicochemical and antioxidant properties of sodiumalginate isolated from a Tunisian brown seaweed. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 1358–1367.
252. Serrano, C., Matos, O., Teixeira, B., Ramos, C., Neng, N., Nogueira, J., Nunes, M.L., Marques, A. (2011). Antioxidant and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 1554-1560.
253. Sharafati-Chaleshtori, R., Rokni, N., Rafieian-Kopaei, M., Drees, F., Salehi, E. (2015). Antioxidant and antibacterial activity of basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil in beef burger. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 17, 817-826.
254. Sharma, N., Baldi, A. (2016). Exploring versatile applications of cyclodextrins: an overview. *Drug Delivery*, 23 (3), 729-747.
255. Shen, Z., Kamdem, D.P. (2015). Development and characterization of biodegradable chitosan filmscontaining two essential oils. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 289–296.
256. Shin, J., Mokwena, K. (2012). The potential of triacetyl- $\beta$ -cyclodextrin and its inclusion complex with AITC for LDPE film extrusion. In *Proceedings of the 18th IAPR World Packaging Conference*, San Luis Obispo, CA, USA, 17–21 June, pp. 481–486.
257. Shojaee-Aliabadi, S., Hosseini, H., Mohammadifar, M.A., Mohammadi, A., Ghasemlou, M., Ojagh, S.M., Hosseini, S.M., Khaksar, R. (2013). Characterization of antioxidant-antimicrobial  $\kappa$ -carrageenan films containing *Satureja hortensis* essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 52, 116– 124.
258. Sienkiewicz, M., Łysakowska, M., Denys, P., & Kowalczyk, E. (2012). The antimicrobial activity of thymus essential oil against multidrug resistant clinical bacterial strains. *Microbial Drug Resistance*, 18, 137–48.
259. Simon, J.E., Quinn, J. And Murray, R.G. (1990). *Basil: A source of essential oils*. *Advances in new crops*. Timber Press, Portland, OR. 484-489.
260. Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
261. Siracusa, V., Rocculi, P., Romani, S., Dalla Rosa, M. (2008). Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 19, 634-643.
262. Siripatrawan, U., Harte, B.R. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 24, 770-775.
263. Siro, I., Fenyvesi, E., Szente, L., De Meulenaer, B., Devlieghere, F., Orgovanyi, J., Senyi, J., Barta, J. (2006). Release of alpha-tocopherol from antioxidative low-density polyethylene film into fatty food simulant: Influence of complexation in beta-cyclodextrin. *Food Additives and Contaminants*, 23, 845–853.

264. Skočibušić, M., Bezić, N. (2004). Phytochemical analysis and in vitro antimicrobial activity of two *Satureja* species essential oils. *Phytotherapy Research*, 18, 967-970.
265. Skočibušić, M., Bezić, N., Dunkić, V. (2006). Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis. growing in Croatia. *Food Chemistry*, 96(1), 20–28.
266. Soares, R.M.D., Maia, G.S., Rayas-Duarte, P., Soldi, V. (2009). Properties of filmogenic solutions of gliadin crosslinked with 1-(3-dimethyl aminopropyl)-3-ethylcarbodiimidehydrochloride/N-hydroxysuccinimide and cysteine. *Food Hydrocolloids*, 23 (1), 181–187.
267. Songkro, S., Hayook, N., Jaisawang, J., Maneenuan, D., Chuchome, T., Kaewnopparat, N. (2012). Investigation of inclusion complexes of citronella oil, citronellal and citronellol with  $\beta$ -cyclodextrin for mosquito repellent. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 72, 339–355.
268. Souza, A.C., Benze, R., Ferrão, E.S., Ditchfield, C., Coelho, A.C.V., Tadini, C.C. (2012). Cassava starch biodegradable films: Influence of glycerol and clay nanoparticles content on tensile and barrier properties and glass transition temperature. *LWT-Food Science and Technology*, 46, 110–117.
269. Souza, A.C., Goto, G.E.O., Mainardi, J.A., Coelho, A.C.V., Tadini, C.C. (2013). Cassava starch composite films incorporated with cinnamon essential oil: Antimicrobial activity, microstructure, mechanical and barrier properties. *LWT - Food Science and Technology*, 54(2), 346-352.
270. Sun, X., Sui, S., Ference, C., Zhang, Y., Sun, S., Zhou, N., Zhu, W., Zhou, K. (2014). Antimicrobial and mechanical properties of  $\beta$ -cyclodextrin inclusion with essential oils in chitosan films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 8914–8918.
271. Szejtli J. (1998). Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Reviews*, 98(5), 1743-1753.
272. Szente, L., Fenyvesi, É. (2018). Cyclodextrin - enabled polymer composites for packaging. *Molecules*, 23, 1556.
273. Szente, L., Szejtli, J. (1999). Highly soluble cyclodextrin derivatives: Chemistry, properties, and trends in development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 36(1), 17–28.
274. Takala, P. N., Vu, K. D., Salmieri, S., Khan, R. A., & Lacroix, M. (2013). Antibacterial effect of biodegradable active packaging on the growth of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in fresh broccoli stored at 4°C. *LWT - Food Science and Technology*, 53(2), 499-506.
275. Tee, O.S., Gadosy, T.A., Giorgi, J.B. (1997). Effect of  $\beta$ -cyclodextrin on the reaction of  $\alpha$ -amino acid anions with p-nitrophenyl acetate and p-nitrophenyl hexanoate. *Canadian Journal of Chemistry*, 75(1), 83–91.
276. Teixeira, B., Marques, A., Pires, C., Ramos, C., Batista, I., Saraiva, J.A., Nunes, M.L. (2014). Characterization of fish protein films incorporated with essential oils of clove, garlic and origanum: Physical, antioxidant and antibacterial properties. *LWT-Food Science and Technology*, 59 (1), 533–539.
277. Tongnuanchan, P., Benjakul, S., Prodpran, T. (2012). Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils. *Food Chemistry*, 134 (3), 1571-1579.
278. Tongnuanchan, P., Benjakul, S., Prodpran, T. (2013). Physico-chemical properties, morphology and antioxidant activity of film from fish skin gelatin incorporated with root essential oils. *Journal of Food Engineering*, 117(3), 350-360.

279. Trelea, I. C., Raoult-Wack, A. L., Trystram, G. (1997). Note: Application of neural network modelling for the control of dewatering and impregnation soaking process (osmotic dehydration) Nota: Aplicación del sistema de simulación de redes neurales para el control de la deshidratación osmótica. *Food Science and Technology International*, 3, 459-465.
280. Trifković, K. (2016). Hidrogelovi na bazi hitozana za kontrolisano otpuštanje polifenola. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet.
281. Tumbas Šaponjac, V., Čanadanović-Brunet, J., Četković, G., Jakišić, M., Djilas, S., Vulić, J., Stajčić, S. (2016). Encapsulation of beetroot pomace extract: RSM optimization, storage and gastrointestinal stability. *Molecules*, 21, 584.
282. Ultee, A., Bennik, M.H.J., Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1561-1568.
283. Valderrama, A., Rojas De, G. (2017) Traceability of active compounds of essential oils in antimicrobial food packaging using a chemometric method by ATR-FTIR. *American Journal of Analytical Chemistry*, 8, 726-741.
284. Valizadeh, S., Fakheri, T., Mahmoudi, R., Katiraei, F., Gajarbeygi, P. (2014). Evaluation of antioxidant, antibacterial, and antifungal properties of *Satureja hortensis* essential oil, *Biotechnology and Health Sciences*, 1(3), 24733.
285. Varona, S., Rojo Rodríguez, S., Martín, Á., Cocero, M.J., Serra, A.T., Crespo, T., Duarte, C.M.M. (2013). Antimicrobial activity of lavandin essential oil formulations against three pathogenic food-borne bacteria. *Industrial Crops and Products*, 42, 243–250.
286. Vartiainen, J., Vähä-Nissi, M., Harlin, A. (2014). Biopolymer films and coatings in packaging applications: a review of recent developments. *Materials Sciences and Applications*, 5, 708–718.
287. Vaštag, Ž., Popović, Lj., Popović, S., Krimer, V., Peričin, D. (2010). Hydrolysis of pumpkin oil cake protein isolate and free radical scavenging activity of hydrolysates; Influence of temperature, enzyme/substrate ratio and time. *Food and Bioproducts Processing*, 88, 277–282.
288. Vaštag, Ž., Popović, Lj., Popović, S., Krimer, V., Peričin, D. (2011). Production of enzymatic hydrolysates with antioxidant and angiotensin- I converting enzyme inhibitory activity from pumpkin oil cake protein isolate. *Food Chemistry*, 124, 1316–1321.
289. Venyaminov, S.Yu., Kalnin, N.N. (1990). Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H<sub>2</sub>O) solutions. I. Spectral parameters of amino acid residue absorption bands. *Biopolymers*, 30, 1243-1257.
290. Vladić, J. (2017). Savremene metode ekstrakcije rtanjskog čaja (*Satureja montana* L.), hemijski sastav i biološka aktivnost odabranih ekstrakata. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad.
291. Vu, C.H.T., Won, K. (2013). Novel water-resistant UV-activated oxygen indicator for intelligent food packaging. *Food Chemistry*, 140, 52–56.
292. Vu, K.D., Hollingsworth, R.G., Leroux, E., Salmieri, S., Lacroix, M. (2011). Development of edible bioactive coating based on modified chitosan for increasing the shelf life of strawberries. *Food Research International*, 44(1), 198-203.

293. Wang, H., Sun, H., He, J. (2016). Hydroxypropyl methylcellulose films incorporated with antibacterial cinnamaldehyde microcapsules. 5<sup>th</sup> International Conference on Materials Engineering for Advanced Technologies (ICMEAT 2016), August 5–6, Quebec City, Canada.
294. Wang, J., Cao, Y., Sun, B., Wang, C. (2011). Physicochemical and release characterisation of garlic oil- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes. *Food Chemistry*, 127(4), 1680-1685.
295. Wang, X., Luo, Z., Xiao, Z. (2014). Preparation, characterization, and thermal stability of  $\beta$ -cyclodextrin/soybean lecithin inclusion complex. *Carbohydrate Polymers*, 101, 1027–1032.
296. Weber, C.J. (2000). Biobased packaging materials for the food industry – Status and Perspective. In: Weber, C.J. (Ed.). Report of Food Biopack Project, KVL, Frederiksberg C, Denmark.
297. Wen, P., Zhu, D.H., Feng, K., Liu, F.J., Lou, W.Y., Zong, M.-H., Wu, H. (2016). Fabrication of electrospun polylactic acid nanofilm incorporating cinnamon essential oil/ $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex for antimicrobial packaging. *Food Chemistry*, 196, 996–1004.
298. Wieser, H. (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, 24, 115–119.
299. Wittaya T. (2012). Protein-based edible films: characteristics and improvement of properties, structure and function of food engineering. In: Eissa, A.A. (Ed.). Structure and Function of Food Engineering, InTech, Rijeka, Croatia.
300. Wood, W.E. (2000). Improved aroma barrier properties in food packaging with cyclodextrins. In Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Cyclodextrin Symposium, Ann Arbor, MI, USA, 21–24 May, pp. 338–347.
301. Wu, J., Ge, S., Liu, H., Wang, S., Chen, S., Wang, J., Li, J., Zhang, Q. (2014). Properties and antimicrobial activity of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin-chitosan films incorporated with oregano essential oil for fish preservation. *Food Packaging and Shelf Life*, 2, 7-16.
302. Wu, J., Sun, X., Guo, X., Ji, M., Wang, J., Cheng, C., Chen, L., Wen, C., Zhang, Q. (2018). Physicochemical, antioxidant, in vitro release, and heat sealing properties of fish gelatin films incorporated with  $\beta$ -cyclodextrin/curcumin complexes for apple juice preservation. *Food and Bioprocess Technology*, 11, 447–461.
303. [www.european-bioplastic.org](http://www.european-bioplastic.org)
304. [www.plasticseurope.org](http://www.plasticseurope.org)
305. Xiang, Q., Yu, J., Wong, P.K. (2011). Quantitative characterization of hydroxyl radicals produced by various photocatalysts. *Journal of Colloid and Interface Science*, 357(1), 163-167.
306. Xu, T., Gao, C.C., Feng, X., Yang, Y., Shen, X., Tang, X. (2019). Structure, physical and antioxidant properties of chitosan-gum arabic edible films incorporated with cinnamon essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134, 230–236.
307. Yamazaki, K., Kawai, Y., Inoue, N. (2004). Enhancement of antilisterial activity of essential oil constituents by nisin and diglycerol fatty acid ester. *Food Microbiology*, 21, 283–289.
308. Yanishlieva, N.V., Marinova, E.M., Gordon, M.H., Raneva, V.G. (1999). Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*, 64, 59-66.
309. Ye, Y., Zhu, M., Miao, K., Li, X., Li, D., Mu, C. (2017). Development of antimicrobial gelatin-based edible films by incorporation of trans-anethole/ $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex. *Food Bioprocess Technology*, 10, 1844–1853.

310. Yoon, Y., Swales Jr, G., Margavio, T. M. (1993). A comparison of discriminant analysis versus artificial neural networks. *Journal of the Operational Research Society*, 44, 51-60.
311. Yun, Y.S., Nakajima, Y., Iseda, E., Kunugi, A. (2003). Determination of antioxidant activity of herbs by ESR. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 44 (1), 59-62.
312. Zahedi, Y., Ghanbarzadeh, B., Sedaghat, N. (2010). Physical properties of edible emulsified films based on pistachio globulin protein and fatty acids. *Journal of Food Engineering*, 100, 102–108.
313. Zhang, Y., Rempel, C., McLaren, D. (2014a). Edible coating and film materials: carbohydrates. In: Han, J.H. (Ed.). *Innovations in Food Packaging*, Academic Press, San Diego, CA, United States, pp. 305–323.
314. Zhang, Y., Simpson, B.K., Dumont, M-J. (2018). Effect of beeswax and carnauba wax addition on properties of gelatin films: A comparative study. *Food Bioscience*, 26, 88–95.
315. Zhang, Y.B., Wang, J.W., Jiang, P.P., Li, Y.X., Liu, X.Y. (2014b) Physical and mechanical properties of chitosan films incorporated with Florida mandarin oil. *Advanced Materials Research*, 1153–1156.
316. Zhavah, S., Mohsenifar, A., Beiki, M., Tahereh Khalili, S., Abdollahi, A., Rahmani-Cherati, T., Tabatabaei, M. (2015). Encapsulation of *Cuminum cyminum* essential oils in chitosan-caffeic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *Industrial Crops and Products*, 69, 251–256.
317. Витас, Ј. (2013). Антиоксидативна активност ферментисаних млечних производа добијених помоћу комбухе. Докторска дисертација, Универзитет у Новом Саду, Технолошки факултет Нови Сад.
318. Шупут, Д. (2016). Синтеза, карактеризација, оптимизација својстава и примена јестивог, активног амбалажног материјала на бази скроба. Докторска дисертација, Универзитет у Новом Саду, Технолошки факултет Нови Сад.



## ***7. ПРИЛОЗИ***

## СПИСАК СКРАЋЕНИЦА

10%EtOH	енг. <i>10 % ethanol</i>	10 % етанол
3%AA	енг. <i>3 % acetic acid</i>	3 % сирћетна киселина
96%EtOH	енг. <i>96 % ethanol</i>	96 % етанол
a.m.u	енг. <i>atomic mass unit</i>	јединица атомске масе
ANN	енг. <i>artificial neural network</i>	вештачка неуронска мрежа
ANOVA	енг. <i>analysis of variance</i>	анализа варијансе
CD	енг. <i>cyclodextrin</i>	циклодекстрин
CFU	енг. <i>colony forming unit</i>	јединица која формира колонију
DPPH	енг. <i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>	2,2-дифенил-1-пикрилхидразил
DW	енг. <i>distilled water</i>	дестилована вода
EAB	енг. <i>elongation at break</i>	издужење при кидању
FDA	енг. <i>Food and Drug Administration</i>	Управа за храну и лекове
FRAP	енг. <i>ferric ion reducing antioxidant power</i>	способност редукције Fe <sup>3+</sup> јона
FTIR	енг. <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>	Фурије трансформишућа инфрацрвена спектроскопија
GC/MS	енг. <i>gas chromatography/mass spectrometry</i>	гасно хроматографска масена спектрометрија
GLY	енг. <i>glycerol</i>	глицерол
GRAS	енг. <i>generally recognized as safe</i>	општепризнате као сигурне
HPLC	енг. <i>high pressure liquid chromatography</i>	течна хроматографија под високим притиском
IC	енг. <i>inclusion complex</i>	инклузиони комплекс
MC	енг. <i>moisture content</i>	садржај влаге
MLP	енг. <i>multi-layer perceptron</i>	вишеслојни перцептрон модел
OH	енг. <i>hydroxyl</i>	хидроксил

PE	енг. <i>polyethylene</i>	полиетилен
PEG 400	енг. <i>polyethylene glycol molecular weight 400</i>	полиетилен гликол молекулске масе 400
PuOC	енг. <i>pumpkin oil cake</i>	погача уљане тикве голице
SD	енг. <i>standard deviation</i>	стандардна девијација
SEM	енг. <i>scanning electron microscopy</i>	електрон скенирајућа микроскопија
SOS	енг. <i>sum of squares</i>	суме квадрата одступања
TPC	енг. <i>total phenol content</i>	укупан садржај фенола
TS	енг. <i>tensile strength</i>	затезна јачина
TSM	енг. <i>total soluble matter</i>	укупна растворљивост
UV	енг. <i>ultra-visible</i>	ултравидљива светлост
VIS	енг. <i>visible light</i>	видљива светлост
WVP	енг. <i>water vapour permeability</i>	пропустљивост водене паре
WVTR	енг. <i>water vapour transmission rate</i>	брзина пропустљивости водене паре
ZI	енг. <i>zone of inhibition</i>	зона инхибиције
$\alpha$ -CD	енг. <i><math>\alpha</math>-cyclodextrin</i>	$\alpha$ -циклодекстрин
$\beta$ -CD	енг. <i><math>\beta</math>-cyclodextrin</i>	$\beta$ -циклодекстрин
$\beta$ -CD/EO	енг. <i><math>\beta</math>-cyclodextrin/essential oil</i>	$\beta$ -циклодекстрин/етарско уље
$\beta$ -CD/EOsm	енг. <i><math>\beta</math>-cyclodextrin/essential oil <i>S. montana</i></i>	$\beta$ -циклодекстрин/етарско уље <i>S. montana</i>
$\gamma$ -CD	енг. <i><math>\gamma</math>-cyclodextrin</i>	$\gamma$ -циклодекстрин
EE	енг. <i>encapsulation efficiency</i>	ефикасност инкапсулације
EO	енг. <i>essential oil</i>	етарско уље

## СПИСАК ТАБЕЛА

Табела 2. 1. Преглед примене етарских уља код активних биополимерних амбалажних материјала ( <i>Atares u Chiralt, 2016; Ribeiro-Santos u cap., 2017</i> ) .....	40
Табела 2. 2. Технике инкапсулације ( <i>Đorđević u cap., 2015; Trifković, 2016; Катона, 2017</i> ).....	49
Табела 2. 3. Преглед примене циклодекстрина код амбалажних материјала ( <i>Szente u Fenyvesi, 2018</i> ) .....	59
<b>Табела 3. 1.</b> Експериментални модел добијања инклузионог комплекса .....	71
<b>Табела 3. 2.</b> Експериментални модел добијања активних биополимерних филмова на бази <i>PuOC</i> и етарског уља <i>S. montana</i> или <i>O. basilicum</i> .....	76
<b>Табела 3. 3.</b> Експериментални модел добијања активних биополимерних филмова на бази <i>PuOC</i> и етарског уља <i>S. montana</i> или инклузионог комплекса .....	77
<b>Табела 3. 4.</b> Експериментални модел одређивања миграције карвакрола и тимола из различитих биополимерних активних материјала у различите симулаторе хране .....	87
<b>Табела 4. 1.</b> Хемијски састав етарског уља <i>S. montana</i> .....	93
<b>Табела 4. 2.</b> Хемијски састав етарског уља <i>O. basilicum</i> .....	95
<b>Табела 4. 3.</b> Укупан садржај фенола у етарским уљима <i>S. montana</i> и <i>O. basilicum</i> .....	104
<b>Табела 4. 4.</b> Антиоксидативна активност етарских уља <i>S. montana</i> и <i>O. basilicum</i> .....	106
<b>Табела 4. 5.</b> Антибактеријска активност етарских уља <i>S. montana</i> и <i>O. basilicum</i> .....	107
<b>Табела 4. 6.</b> Дебљине активних биополимерних филмова на бази <i>PuOC</i> и етарског уља <i>S. montana</i> или <i>O. basilicum</i> .....	112
<b>Табела 4. 7.</b> Физичко-хемијске особине активних биополимерних филмова на бази <i>PuOC</i> и етарског уља <i>S. montana</i> или <i>O. basilicum</i> .....	116
<b>Табела 4. 8.</b> Укупан садржај фенола активних биополимерних филмова на бази <i>PuOC</i> и етарског уља <i>S. montana</i> или <i>O. basilicum</i> .....	125
<b>Табела 4. 9.</b> Антибактеријска активност активних биополимерних филмова на бази <i>PuOC</i> и етарског уља <i>S. montana</i> или <i>O. basilicum</i> .....	130
<b>Табела 4. 10.</b> Резиме вештачког модела неуронске мреже (перформансе и грешке) за циклусе обуке, тестирања и валидације .....	137
<b>Табела 4. 11.</b> Елементи матрице $W_1$ и вектора $V_1$ за прорачун ефикасност инкапсулације .....	137
<b>Табела 4. 12.</b> Елементи матрице $W_2$ и вектора $V_2$ за прорачун ефикасност инкапсулације .....	138
<b>Табела 4. 13.</b> Физичко-механичке особине активних биополимерних филмова на бази <i>PuOC</i> и етарског уља <i>S. montana</i> или инклузионог комплекса .....	150
<b>Табела 4. 14.</b> Физичко-хемијске особине активних биополимерних филмова на бази <i>PuOC</i> и етарског уља <i>S. montana</i> или инклузионог комплекса.....	152
<b>Табела 4. 15.</b> Резиме модела вештачке неуронске мреже (перформансе и грешке) за циклусе обуке, тестирања и валидације .....	168
<b>Табела 4. 16.</b> Елементи матрице $W_1$ и вектор $V_1$ за садржај карвакрола и тимола .....	169
<b>Табела 4. 17.</b> Елементи матрице $W_2$ и вектор $V_2$ за садржај карвакрола и тимола .....	169

## СПИСАК СЛИКА

<b>Слика 2. 1.</b> Производња пластике у Свету и Европи у 2019. години ( <i>www.plasticseurope.org</i> ).....	9
<b>Слика 2. 2.</b> Укупна потражња пластике у Европи и њена примена у различитим гранама индустрије ( <i>www.plasticseurope.org</i> ).....	9
<b>Слика 2. 3.</b> Животни циклус биопластике ( <i>Siracusa u cap., 2008; www.european-bioplastic.org</i> ) .....	12
<b>Слика 2. 4.</b> Механизам формирања биополимерних филмова ( <i>Chinabhark, 2005</i> ).....	20
<b>Слика 2. 5.</b> Механизам редукције <i>Folin-Ciocalte</i> реагенса.....	28
<b>Слика 2. 6.</b> Радикалска и редукована форма DPPH ( <i>Hromiš, 2015</i> ).....	29
<b>Слика 2. 7.</b> Основни типови микрокапсула: (а) матрице, (b) резервоар, (c) мулти-мембранске честице, (d) мулти-језгро, (e) са фосфолипидним довослојем, (f) капсуле настале процесом молекуларне инклузије ( <i>Ђорђевић u cap., 2015</i> ).....	46
<b>Слика 2. 8.</b> Подела омотача који се користе у поступку инкапсулације ( <i>Gaonkar u cap., 2014</i> ).....	48
<b>Слика 2. 9.</b> Структура и пречник шупљине (а) $\alpha$ -циклодекстрина ( $\alpha$ -CD), (b) $\beta$ -циклодекстрина ( $\beta$ -CD) и (c) $\gamma$ -циклодекстрина ( $\gamma$ -CD) ( <i>Bruns, 2019</i> ) .....	52
<b>Слика 2. 10.</b> Шематски приказ структуре $\beta$ -циклодекстрина ( <i>Patel, 2017</i> ) .....	52
<b>Слика 2. 11.</b> Поступак формирања $\beta$ -циклодекстрин инклузионог комплекса ( <i>Sharma u Baldi, 2016</i> ) .....	54
<b>Слика 2. 12.</b> Различити начини уградње $\beta$ -циклодекстрин инклузионог комплекса у активне материјале: а) уграђен у полимер b) као премаз на полимерни материјал ( <i>Szente u Fenyvesi, 2018</i> ) .....	57
<b>Слика 3. 1.</b> План експерименталног рада докторске дисертације са означеним корацима (1-6) ....	66
<b>Слика 3. 2.</b> Добијање инклузионог комплекса.....	70
<b>Слика 3. 3.</b> Добијање активних биополимерних филмова на бази $PuOC$ .....	74
<b>Слика 3. 4.</b> Добијање активних биополимерних филмова на бази $PuOC$ и етарског уља <i>S. montana</i> или <i>O. basilicum</i> .....	75
<b>Слика 3. 5.</b> Добијање активних биополимерних филмова на бази $PuOC$ и инклузионог комплекса 77	
<b>Слика 4. 1.</b> FTIR спектар етарског уља <i>S. montana</i> .....	98
<b>Слика 4. 2.</b> FTIR спектри чистих компоненти: а) карвакрол, b) тимол и c) р-цимен ( <i>Valderrama u Rojas De, 2017</i> ).....	99
<b>Слика 4. 3.</b> FTIR спектри етарског уља <i>S. montana</i> у различитим концентрацијама (1-5 % (v/v)) ....	100
<b>Слика 4. 4.</b> FTIR спектар етарског уља <i>O. basilicum</i> .....	101
<b>Слика 4. 5.</b> FTIR спектар чисте компоненте линалол ( <i>Jabir u cap., 2018</i> ).....	102
<b>Слика 4. 6.</b> FTIR спектри етарског уља <i>O. basilicum</i> у различитим концентрацијама (1-5 % (v/v)) ...	103
<b>Слика 4. 7.</b> Пречник зоне инхибиције етарског уља <i>S. montana</i> у концентрацији од 5 % према <i>V. cereus</i> .....	108
<b>Слика 4. 8.</b> Активни биополимерни филмова на бази $PuOC$ : а) контрола, b), c), d), e), f) са етарским уљем <i>S. montana</i> у концентрацијама од 1, 2, 3, 4, 5 % (v/v), редом; g), h), i), j), k) са етарским уљем <i>O. basilicum</i> у концентрацијама од 1, 2, 3, 4, 5 % (v/v), редом.....	110
<b>Слика 4. 9.</b> Активни биополимерни филм на бази $PuOC$ са етарским уљем <i>S. montana</i> у концентрацији од 5 % .....	111

<b>Слика 4. 10.</b> Затезна јачина активних биополимерних филмова на бази $PuOC$ и етарског уља <i>S. montana</i> или <i>O. basilicum</i> . Различита слова указују на значајне разлике међу узорцима ( $p < 0,05$ ). 113	113
<b>Слика 4. 11.</b> Издужење при кидању активних биополимерних филмова на бази $PuOC$ и етарског уља <i>S. montana</i> или <i>O. basilicum</i> . Различита слова указују на значајне разлике међу узорцима ( $p < 0,05$ ). ..... 113	113
<b>Слика 4. 12.</b> Брзина пропустљивости водене паре активних биополимерних филмова на бази $PuOC$ и етарског уља <i>S. montana</i> или <i>O. basilicum</i> . Различита слова указују на значајне разлике међу узорцима ( $p < 0,05$ ). ..... 118	118
<b>Слика 4. 13.</b> Пропустљивост светлости активних биополимерних филмова на бази $PuOC$ и етарског уља <i>S. montana</i> у различитим концентрацијама (1 – 5 % (v/v))..... 120	120
<b>Слика 4. 14.</b> Пропустљивост светлости активних биополимерних филмова на бази $PuOC$ и етарског уља <i>O. basilicum</i> у различитим концентрацијама (1 – 5 % (v/v)) ..... 120	120
<b>Слика 4. 15.</b> FTIR спектри активних биополимерних филмова на бази $PuOC$ и етарског уља <i>S. montana</i> у различитим концентрацијама (1 – 5 % (v/v))..... 122	122
<b>Слика 4. 16.</b> FTIR спектри активних биополимерних филмова на бази $PuOC$ и етарског уља <i>O. basilicum</i> у различитим концентрацијама (1 – 5 % (v/v)) ..... 122	122
<b>Слика 4. 17.</b> Способност неутрализације DPPH радикала активних биополимерних филмова на бази $PuOC$ и етарског уља <i>S. montana</i> или <i>O. basilicum</i> . Различита слова указују на значајне разлике међу узорцима ( $p < 0,05$ ). ..... 127	127
<b>Слика 4. 18.</b> Способност неутрализације OH радикала активних биополимерних филмова на бази $PuOC$ и етарског уља <i>S. montana</i> или <i>O. basilicum</i> . Различита слова указују на значајне разлике међу узорцима ( $p < 0,05$ ). ..... 128	128
<b>Слика 4. 19.</b> Редукциона моћ активних биополимерних филмова на бази $PuOC$ и етарског уља <i>S. montana</i> или <i>O. basilicum</i> . Различита слова указују на значајне разлике међу узорцима ( $p < 0,05$ ). 129	129
<b>Слика 4. 20.</b> Дупла зона инхибиције активног филма на бази $PuOC$ и етарског уља <i>S. montana</i> у концентрацији од 4 % према <i>V. cereus</i> ..... 132	132
<b>Слика 4. 21.</b> Дупла зона инхибиције активног филма на бази $PuOC$ и етарског уља <i>S. montana</i> у концентрацији од 5 % према <i>V. cereus</i> ..... 132	132
<b>Слика 4. 22.</b> Ефикасност инкапсулације инклузионих комплекса рачуната у два растварача: метанол:вода:сирћетна киселина ( $MeOH:H_2O:AA$ ) и метанол:етанол ( $MeOH:EtOH$ ), односа етарско уље (EO): $\beta$ -циклодекстрин ( $\beta$ -CD)-10:90; 15:85; 20:80, добијени сушењем у сушници или лиофилизатору ..... 135	135
<b>Слика 4. 23.</b> Релативни значај утицајних параметара на вредности ефикасност инкапсулације.... 139	139
<b>Слика 4. 24.</b> SEM микрографије чистог $\beta$ -циклодекстрина на различитим увећањима: а) x 200 б) x 500 с) x 1500 д) x 3000 ..... 140	140
<b>Слика 4. 25.</b> SEM микрографије инклузионих комплекса, различитих односа етарско уље: $\beta$ -циклодекстрин: а) 10:90 с) 15:85 е) 20:80, добијених поступком лиофилизације; односно б) 10:90 д) 15:85 ф) 20:80, добијених поступком сушења у сушници ..... 141	141
<b>Слика 4. 26.</b> FTIR спектар чистог $\beta$ -циклодекстрина ..... 143	143
<b>Слика 4. 27.</b> FTIR спектри инклузионих комплекса, сушених у лиофилизатору ..... 144	144
<b>Слика 4. 28.</b> FTIR спектри инклузионих комплекса, сушених у сушници ..... 144	144
<b>Слика 4. 29.</b> FTIR спектри инклузионих комплекса у области таласних дужина 1200-900 $cm^{-1}$ : а) лиофилизација, б) сушница: 1 - $\beta$ -CD; 2 - EO: $\beta$ -CD-10:90; 3 - EO: $\beta$ -CD-15:85; 4 - EO: $\beta$ -CD-20:80 ..... 145	145

<b>Слика 4. 30.</b> FTIR спектри инклузионих комплекса у области таласних дужина 3500-3000 $\text{cm}^{-1}$ : а) лиофилизација, б) сушница: 1 - $\beta$ -CD; 2 -EO: $\beta$ -CD-10:90; 3 -EO: $\beta$ -CD-15:85; 4 - EO: $\beta$ -CD-20:80.....	146
<b>Слика 4. 31.</b> Активни биополимерни филмови на бази PuOC са 15 % GLY и : а) 1 %, б) 2 % етарским уљем <i>S. montana</i> ; с) 1 %, d) 2 % инклузионог комплекса.....	148
<b>Слика 4. 32.</b> Активни биополимерни филмови на бази PuOC са 30 % GLY и : а) 1 %, б) 2 % етарским уљем <i>S. montana</i> ; с) 1 %, d) 2 % инклузионог комплекса.....	148
<b>Слика 4. 33.</b> Активни биополимерни филм на бази PuOC са 30 % GLY и 2 % инклузионог комплекса .....	149
<b>Слика 4. 34.</b> Брзина пропустљивости водене паре активних биополимерних филмова на бази PuOC, са 15 % или 30 % GLY и етарског уља <i>S. montana</i> или инклузионог комплекса, у различитим концентрацијама (1 % и 2 %). Различита слова указују на значајне разлике међу узорцима ( $p < 0,05$ ). .....	154
<b>Слика 4. 35.</b> Пропустљивост светлости активних биополимерних филмова на бази PuOC са 15%GLY, и етарског уља <i>S. montana</i> или инклузионог комплекса, у различитим концентрацијама (1 % и 2 %) .....	156
<b>Слика 4. 36.</b> Пропустљивост светлости активних биополимерних филмова на бази PuOC са 30%GLY, и етарског уља <i>S. montana</i> или инклузионог комплекса, у различитим концентрацијама (1 % и 2 %) .....	156
<b>Слика 4. 37.</b> FTIR спектри активних биополимерних филмова на бази PuOC са 15%GLY, и етарског уља <i>S. montana</i> или инклузионог комплекса, у различитим концентрацијама (1 % и 2 %) .....	158
<b>Слика 4. 38.</b> FTIR спектри активних биополимерних филмова на бази PuOC са 30%GLY, и етарског уља <i>S. montana</i> или инклузионог комплекса, у различитим концентрацијама (1 % и 2 %) .....	158
<b>Слика 4. 39.</b> FTIR спектри активних биополимерних филмова на бази PuOC са 15%GLY, у области таласних дужина: а) 3500-3000 $\text{cm}^{-1}$ б) 1150-900 $\text{cm}^{-1}$ : 1 – контрола; 2 – 1% EO; 3 – 2% EO; 4 – 1% $\beta$ -CD/EOsm 5 – 2% $\beta$ -CD/EOsm.....	159
<b>Слика 4. 40.</b> Способност неутрализације DPPH радикала чистих активних једињења етарско уље <i>S. montana</i> и инклузионог комплекса, као и активних филмова на бази PuOC и етарског уља <i>S. montana</i> или инклузионог комплекса, у различитим концентрацијама (1 % и 2 %). Различита слова указују на значајне разлике међу узорцима ( $p < 0,05$ )......	160
<b>Слика 4. 41.</b> Миграција карвакрола из активних биополимерних филмова са етарским уљем <i>S. montana</i> или инклузионим комплексом, у модел растворе: а) 96%EtOH; б) 10%EtOH; с) DW; d) 3%AA .....	165
<b>Слика 4. 42.</b> Миграција тимола из активних биополимерних филмова са етарским уљем <i>S. montana</i> или инклузионим комплексом, у модел растворе: а) 96%EtOH; б) 10%EtOH; с) DW; d) 3%AA .....	167
<b>Слика 4. 43.</b> Релативни значај утицајних параметара на садржај отпуштеног карвакрола .....	171
<b>Слика 4. 44.</b> Релативни значај утицајних параметара на садржа отпуштеног тимола .....	171

## План третмана података

<b>Назив пројекта/истраживања</b>
Истраживање добијања, карактеризација и оптимизација својстава активног, биоразградивог, амбалажног материјала на бази погаче уљане тикве голице
<b>Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање</b>
а) Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду, Република Србија б) Институт Биосенс, Универзитет у Новом Саду, Република Србија
<b>Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање</b>
Истраживања обухваћена овом докторском дисертацијом финансирана су од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, кроз пројекат „Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности”, евиденциони број пројекта ИИИ46010
<b>1. Опис података</b>
<b>1.1 Врста студије</b>
<i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i>
Докторска дисертација
<b>1.2 Врсте података</b>
<b>а) квантитативни</b>
<b>б) квалитативни</b>
<b>1.3. Начин прикупљања података</b>
а) анкете, упитници, тестови
б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи
в) генотипови: навести врсту _____
г) административни подаци: навести врсту _____
<b>д) узорци ткива: навести врсту: погача уљане тикве голице</b>
<b>ђ) снимци, фотографије: навести врсту: фотографије узорака биополимерних филмова</b>
<b>е) текст, навести врсту: литературни наводи</b>



ж) мапа, навести врсту \_\_\_\_\_

з) остало: описати: web садржај

### 1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

#### 1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

**a)** Excel фајл, датотека: .xlsx

**b)** SPSS фајл, датотека \_\_\_\_\_

**c)** PDF фајл, датотека \_\_\_\_\_

**d)** Текст фајл, датотека: .docx

**e)** JPG фајл, датотека: .jpg, .tif

**f)** Остало, датотека:

#### 1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

**a)** број варијабли: велики број

**b)** број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.): велики број

#### 1.3.3. Поновљена мерења

**a)** да

**b)** не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

**a)** временски размак између поновљених мера је између неколико минута и неколико дана

**b)** варијабле које се више пута мере односе се на све експерименталне анализе

**v)** нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као \_\_\_\_\_

Напомене: \_\_\_\_\_

*Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?*

**а) Да**

**б) Не**

*Ако је одговор не, образложити* \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## 2. Прикупљање података

### 2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент, навести тип: инструменталне, физичке, хемијске и биолошке анализе

б) корелационо истраживање, навести тип: вештачке неуронске мреже (енгл. Artificial Neural Networks, ANN)

ц) анализа текста, навести тип: тумачење експериментално добијених резултата, извођење закључака и поређење са литературним подацима

д) остало, навести шта \_\_\_\_\_

*2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).*

Хемијски састав етарских уља - Гасни хроматограф GC 7890B

Механичке особине материјала - Instron Universal Testing Instrument Model No 4301, ASTM standard D882-10 (2010)

Брзина пропустљивости водене паре материјала - ISO 2528 (1995)

Структурне особине, Фурије трансформишућа инфрацрвена спектроскопија - Nicolet IS10 FT-IR спектрофотометар, ASTM D5576:00 (2013)

Биолошке особине узорака - спектрофотометар JENWAY 6300

Обрада података статистички софтвер - Statistica 13.5.0.17

### 2.2 Квалитет података и стандарди

### 2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да **Не**

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) Колики је број недостајућих података? \_\_\_\_\_
- б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да **Не**
- в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података
- \_\_\_\_\_

### 2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података контролисан је применом различитих статистичких метода и понављањем добијених експерименталних резултата.

### 2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Контрола уноса података у матрицу је извршена упоређивањем добијених података са литературним подацима.

## 3. Третман података и пратећа документација

### 3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у Репозиторијуму Универзитета у Новом Саду.

3.1.2. URL адреса накнадно

3.1.3. DOI \_\_\_\_\_

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

- а) **Да**
- б) Да, али после ембарга који ће трајати до \_\_\_\_\_

в) Не

Ако је одговор не, навести разлог \_\_\_\_\_

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

\_\_\_\_\_

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? \_\_\_\_\_

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

\_\_\_\_\_

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

\_\_\_\_\_

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? \_\_\_\_\_

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? **Да** Не

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? **Да** Не

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да Не

Образложити

\_\_\_\_\_

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

#### 4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности ([https://www.paragraf.rs/propisi/zakon\\_o\\_zastiti\\_podataka\\_o\\_licnosti.html](https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html)) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

##### 4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да **Не**

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

---

##### 4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да **Не**

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- а) Подаци нису у отвореном приступу
  - б) Подаци су анонимизирани
  - ц) Остало, навести шта
- 

## 5. Доступност података

### 5.1. Подаци ће бити

**а) јавно доступни**

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

---

*Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:*

---

*5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.*

---

## 6. Улоге и одговорност

*6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података*

Сандра Булут, sbulut@uns.ac.rs

*6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима*

Сандра Булут, sbulut@uns.ac.rs

*6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима*

Сандра Булут, sbulut@uns.ac.rs